

**DNA-gesteuerte Multivalenz: Untersuchungen zur Reichweite
der Bivalenz und Anwendungen in der Assemblierung bi- und
multivalenter Peptidkonjugate**

Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

Im Fach Chemie

eingereicht an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Humboldt-Universität zu Berlin

von M. Sc. Natali Dubel

Präsidentin der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr.-Ing. Dr. Sabine Kunst

Dekan der Mathematisch Naturwissenschaftlichen Fakultät

Prof. Dr. Elmar Kulke

1. Gutachter: Prof. Dr. Oliver Seitz
2. Gutachter: Prof. Dr. Christian Hackenberger
3. Gutachter: Prof. Dr. Thomas Schrader

Tag der mündlichen Prüfung: 23.05.2019

Abstract

Multivalent interactions play an important role in nature and are also used to construct high-affinity binders.

In this work the limit of bivalency based on binding distance, flexibility of the system and monovalent binding-strength was investigated. Modification of DNA with Cucurbit[7]uril (CB[7]) and two adamantane-analogues (Ad1 and Ad2), along with the use of different templates, enabled the construction of diverse bivalent model-systems. By using Cy3- and Cy5-labelled templates, binding affinities could be measured by means of FRET. The results revealed a distance-dependency of the bivalent effect, which decreased with increasing binding distance. The stronger binder (Ad1) was able to benefit from bivalent enhancement at relatively large binding distances compared to the weaker binder (Ad2). This denotes a dependency of the bivalent effect on the monovalent binding strength. Enhanced scaffold-flexibility led to a decrease in binding affinity. The same system was used to investigate the factors leading to crosslinking. The results show that only at high concentrations, and when the system does not have to compete with a bivalent enhancement, can multimolecular structures be formed. This may explain why large distances separate the binding sites of some proteins, such as adaptor proteins. The large distance between binding sites enables them to form multimolecular structures, which is essential for their function.

The second part of this work deals with a bispecific binder. Binding affinities, selectivity and the impact of the binder on receptor activity were tested. Accordingly, oligonucleotides were modified with cilengitide, which is able to bind $\alpha_v\beta_3$ -Integrin, and with a bivalent peptoid, which binds to VEGFR2. The use of different DNA templates enabled construction of several bispecific binders with different binding distances. Measurements with HUVEC cells revealed higher affinities of the bispecific binders compared to the monospecific ones. No binding was observed in the control experiment with HEK293 cells. ELISA-measurements demonstrated that activation or deactivation of the VEGFR2-phosphorylation was distance dependent. The binder with the smallest distance (21 nt) elicited an activation of the VEGFR, whereas larger distances led to deactivation. Consequently, a model system was constructed which was able to control receptor activity.

Kurzzusammenfassung

Multivalente Wechselwirkungen spielen sowohl in der Natur als auch für die Konstruktion hochaffiner Binder eine wichtige Rolle. In dieser Arbeit wurde die Grenze der Bivalenz in Bezug auf den Bindungsabstand, die monovalente Interaktionsstärke und die Flexibilität des Gerüsts untersucht. Die Modifizierung von DNA mit Cucurbit[7]uril und zwei verschiedenen Adamantananaloga (Ad1 und Ad2) sowie die Verwendung verschiedener Template, ermöglichte die Konstruktion diverser bivalenter Modellsysteme. Eine Markierung der Template mit Cy3 und Cy5 ermöglichte die Bestimmung von Bindungsaffinitäten (FRET). Die Ergebnisse zeigten eine Distanzabhängigkeit des bivalenten Effekts, der mit dem Bindungsabstand abnahm. Im Gegensatz zum schwächeren Binder (Ad2), war der stärkere Binder (Ad1) in der Lage auch noch bei großen Abständen von einer bivalenten Verstärkung zu profitieren. Somit besteht eine Abhängigkeit des bivalenten Effekts von der monovalenten Bindungsstärke. Eine Erhöhung der Flexibilität führte zu einer Schwächung der Bindungsaffinität. Mit diesem System wurde anschließend untersucht, unter welchen Bedingungen bivalente Systeme multimolekulare Strukturen ausbilden. Es konnte gezeigt werden, dass verbrückende Strukturen nur bei hohen Konzentrationen und bei Abwesenheit eines bivalenten Effekts vorliegen können. Dies erklärt, warum in bestimmten Proteinen, wie den Adapter Proteinen, die Bindungstaschen in einem großen Abstand vorliegen. Nur dadurch wird eine multimolekulare Bindungsweise ermöglicht, die essentiell für die Funktion solcher Proteine ist.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde ein bispezifischer Binder auf seine Affinität, Selektivität und auf seinen Einfluss auf die Rezeptoraktivität untersucht. Dafür wurden Oligonukleotide mit Cilengitid, welches $\alpha_v\beta_3$ -Integrin binden kann, und mit einem Peptid, welches VEGFR2 binden kann, modifiziert. Durch Verwendung verschiedener Template konnten bispezifische Binder mit unterschiedlichen Ligandenabständen konstruiert werden. Messungen an HUVEC-Zellen ergaben eine höhere Affinität der bispezifischen Binder im Vergleich zu den monospezifischen. Eine Bindung an HEK293-Zellen konnte nicht beobachtet werden. ELISA-Messungen ergaben eine distanzabhängige Aktivierung oder Deaktivierung der Phosphorylierung von VEGFR2. Der Binder mit dem kleinsten Abstand (21 nt) erzeugte eine Aktivierung, während die größeren Abstände zu einer Inhi-

bition der Phosphorylierung führten. Es konnte somit ein Modellsystem konstruiert werden, mit dem die Rezeptoraktivität gesteuert werden konnte.

Die experimentellen Arbeiten wurden in dem Zeitraum von Januar 2014 bis Juni 2018 in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Oliver Seitz am Institut für Chemie (Fachbereich: Organische und Bioorganische Chemie) der Humboldt-Universität zu Berlin angefertigt

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
2 Stand der Forschung	3
2.1 Multivalenz	3
2.2 DNA als Gerüst	8
2.3 Gast-Wirt-Wechselwirkungen	16
2.4 Rezeptor-Oligomerisierung	20
2.5 Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor 2 (VEGFR2)	21
2.5.1 Antagonisten für das VEGFR2	22
2.6 $\alpha_v\beta_3$ -Integrin	24
2.6.1 Struktur von $\alpha_v\beta_3$ -Integrin	24
2.6.2 Antagonisten für das $\alpha_v\beta_3$ -Integrin	25
2.7 Interaktion zwischen VEGFR2 und $\alpha_v\beta_3$ -Integrin	28
3 Zielstellung	30
4 Ergebnisse und Diskussion	33
4.1 Untersuchungen zur Reichweite der Bivalenz	33
4.1.1 Modellsystem zur Messung der Reichweite der Bivalenz	35
4.1.2 Synthese der β -Cyclodextrin modifizierten DNA	38
4.1.3 Synthese der Cucurbit[7]uril-modifizierten DNA	40
4.1.4 Synthese der Adamantan-modifizierten DNA	43
4.1.5 Bindungsstudien der β -Cyclodextrin/Rhodamin B-Interaktion	44
4.1.6 Verdrängung von Rhodamin B mit Adamantyl-DNA	50
4.1.7 Verdrängung von Pyronin B mit Adamantyl-DNA	56
4.1.8 Bindungsaffinitäten zwischen CB[7]-DNA und Admantyl-DNA	62
4.1.9 Theoretische Berechnungen zur Reichweite der Bivalenz	70
4.2 Untersuchungen zu multimolekularen Bindungsmodi	72
4.3 Zusammenfassung: Grenze der Bivalenz	78
4.4 Bispezifische Inhibitoren für VEGFR2 und $\alpha_v\beta_3$ -Integrin	81
4.4.1 Einleitung und Problemstellung	81
4.4.2 Synthese Cilengitid-modifizierter DNA	84
4.4.3 Synthese der Peptoid-modifizierten DNA	87
4.4.3.1 Synthese der Peptoid1-DNA-Konjugate (P1-DNA)	88
4.4.3.2 Synthese der Peptoid2-DNA-Konjugate (P2-DNA)	90
4.4.4 Bindung von Peptoid-Cilengitid-DNA-Konjugaten an HUVEC Zellen	93
4.4.5 Bestimmung des Einflusses auf die VEGFR2-Phosphorylierung	106
4.5 Zusammenfassung: Bispezifische Binder	110
5 Zusammenfassung und Ausblick	112

5.1 Zusammenfassung	112
5.2 Ausblick	120
6 Experimenteller Teil	122
6.1 Materialien	122
6.1.2 Reagenzien	122
6.1.2 Lösungsmittel und Materialien für die Chromatographie	123
6.1.3 Dünnschichtchromatographie	123
6.1.4 Säulenchromatographie	124
6.1.5 Oligonukleotide	124
6.1.6 Materialien für Biochemische Arbeiten	124
6.1.7 Puffer	125
6.2 Geräte	126
6.3 Allgemeine Arbeitsvorschriften	131
6.3.1 Synthese des β -Cyclodextrin-Maleinimids	131
6.3.2 Synthese des Azido-modifizierten Cucurbit[7]urils	131
6.3.3 Synthese von 2-Cyanoethyl-1-hexanthiotrityl- <i>N,N</i> -diisopropylphosphoramidit 9	131
6.3.4 Synthese vom Linker modifizierten Rhodamin B (23)	131
6.3.5 Experimentelle Vorschrift für die DNA-Synthese	132
6.3.6 Synthese der β -Cyclodextrin modifizierten DNA	132
6.3.7 Synthese der Adamantyl-modifizierten DNA	134
6.3.8 Synthese der CB7]-modifizierten DNA	135
6.3.9 Synthese des Peptoids 1	136
6.3.10 Synthese des Peptoids 2	137
6.3.11 Synthese des Cilengitids	139
6.3.12 Synthese der Peptoid-modifizierten DNA	142
6.3.13 Synthese der Cilengitid-modifizierten DNA	143
6.3.14 Denaturierungsexperimente	145
6.4 Affinitätsmessungen	146
6.4.1 Bestimmung der Affinitäten von Rhodamin B/ β -Cyclodextrin-Systemen	146
6.4.2 Bestimmung der Bindungsaffinität zwischen Rhodamin B und CB[7]-DNA	147
6.4.3 Bestimmung der Bindungsaffinität zwischen Pyronin B und CB[7]-DNA	148
6.4.4 Kontrollexperimente mit Pyronin B	149
6.4.5 Verdrängungsexperiment: Konkurrenz von Rhodamin B mit Adn-DNA-Komplexen aus CB[7]-DNA-Komplexen	149
6.4.6 Konkurrenz von Pyronin B mit Ad2-DNA aus CB[7]-DNA	151
6.4.7 Bestimmung der Bindungskonstanten durch FRET-Messungen	153
6.4.7 Kontrollexperiment zur Untersuchung des Einflusses der Cy5-modifizierten DNA auf die Fluoreszenzintensität der Cy3-Adn-DNA	154
6.4.8 Charakterisierung von Crosslinking	154
6.4.9 Zusatz zu den Berechnungen zur Reichweite des Bivalenzeffekts	156
6.5 Biochemische Methoden	160
6.5.1 Native Gelelektrophorese	160
6.5.2 Behandlung der Zellen mit den Komplexen und anschließende Zelllysis	160

6.5.3 Bestimmung von Proteinkonzentrationen	161
6.5.4 Bestimmung der VEGFR2-Phosphorylierung (Tyr1175)	161
6.5.5 Fluoreszenzmikroskopie	162
7 Anhang	164
7.1 Abkürzungsverzeichnis	164
7.2 DNA-Sequenzen	166
7.3 Statistische Mechanik: Berechnungen zur Konzentrationsabhängigkeit des Bivalenten Effekts bei Verdrängungsexperimenten	171
7.4 Charakterisierung von DNA, Peptiden und Peptidmimetika	175
7.4.1 Charakterisierung von β -Cyclodextrin modifizierter DNA	175
7.4.2 Charakterisierung von CB[7]-modifizierter DNA	177
7.4.4 Charakterisierung von Adamantyl-modifizierter DNA	179
7.4.5 Charakterisierung von Peptoid-modifizierter DNA	183
7.4.6 Charakterisierung von Cilengitid-modifizierter DNA	185
7.4.7 Charakterisierung von linker-modifiziertem Rhodamin B	186
7.4.8 Schmelzkurven	187
7.5 Bindungskurven	191
7.5.1 Bindungskurven von β -Cyclodextrin und Rhodamin B	191
7.5.2 CB[7]/Rhodamin B Bindungskurven	192
7.5.3 Fluoreszenzänderung bei Konkurrenz von Rhodamin B aus CB[7]-DNA mit Adamantyl-DNA	192
7.5.4 Fluoreszenzänderung bei Konkurrenz von Pyronin B aus CB[7]-DNA mit Adamantyl-DNA	193
7.5.5 Bindungskurven von CB[7]-DNA und Ad1-DNA	195
7.5.6 Bindungskurven von CB[7]-DNA und Ad2-DNA	196
7.5.7 Bindungskurven von CB[7]-DNA und Ad1-DNA bei verschiedenen Templatkonzentrationen	197
7.6 Mikroskopiebilder	198
8 Literaturverzeichnis	207
9 Danksagung	216

1 Einleitung

Die Natur nutzt verschiedene Arten der Wechselwirkung, um spezifische Interaktionen zu ermöglichen. Vor allem multivalente Wechselwirkungen, bei denen mehrere Rezeptoren einer Einheit mit mehreren Liganden einer anderen Einheit wechselwirken, spielen eine wichtige Rolle. Mit steigender Zahl der Interaktionsstellen können Affinitäten erhöht, durch eine partielle Bindung Signalabstufungen ermöglicht und durch heteromultivalente Bindungen die Spezifität erhöht werden. Prominente Beispiele hierfür sind die Bindung eines Virus oder eines Bakteriums an die Oberfläche einer Zelle, die Interaktion von Zellen mit anderen Zellen oder mit polyvalenten Molekülen, wie z. B. zwischen Antikörpern und Makrophagen, oder die Bindung von polyvalenten Molekülen an andere polyvalente Moleküle, wie die Interaktion von Transkriptionsfaktoren mit mehreren Stellen der DNA.¹⁰ Ein Beispiel für eine Signalabstufung ist der Mechanismus der Antikörpervermittelten Bindung von Makrophagen an Pathogene. Bindet nur ein Antikörper an ein Pathogen, so bindet die Makrophage den Antikörper und somit das Pathogen nicht. Sind allerdings mehrere Antikörper am Pathogen gebunden, so wird durch die Polyvalenz und die höhere Affinität die Bindung des Makrophagen begünstigt. Durch heteromere Polyvalenz kann nicht nur die Affinität, sondern auch die Spezifität erhöht werden. Dabei umfasst eine solche polyvalente Wechselwirkung mehrere unterschiedliche Liganden/Rezeptor-Paare. Ein Beispiel hierfür ist *E. coli* (*escherichia coli*), welches direkt und indirekt an Harnwegs-Endothelzellen bindet. Die direkte Interaktion erfolgt durch die Wechselwirkung von mehreren Protein G des *E. coli* mit Glycoproteinen an der Oberfläche der Zelle. Durch multiple F-Proteine interagiert *E. coli* auch mit Fibronectin, einem löslichen Glycoprotein. Dieses geht wiederum polyvalente Wechselwirkungen mit der Zelle ein, was zu einer indirekten Bindung des *E. coli* an die Zelle führt.¹⁰ Dies ermöglicht nicht nur eine affinere, sondern auch eine selektivere Bindung. In der Natur gibt es weiterhin polyvalente Interaktionen, die zu einer Ausbildung von multimolekularen Strukturen führen. Somit wird die Rekrutierung von bestimmten Proteinen an eine Stelle der Zelle ermöglicht. Beispiele hierfür sind die Adapterproteine, wie das Intersektin,¹¹ das Adapterprotein 2 (AP2)¹², Clathrin,¹³⁻¹⁴ oder GRb2- (*growth factor receptor-bound protein 2*), NCK- (*cytoplasmatic protein*) verwandte Adaptoren.¹⁵⁻¹⁶

Gerade weil multivalente Interaktionen in der Natur so prominent sind, ist das Verständnis solcher Wechselwirkungen sehr wichtig. Solche Interaktionen sind jedoch bis heute noch nicht vollkommen erforscht. Durch neue Erkenntnisse könnten nicht nur bestimmte Prozesse in der Natur besser nachvollzogen werden, sondern auch potentere Therapeutika entwickelt werden.

Um systematisch multivalente biologische Wechselwirkungen zu untersuchen und um multivalente Inhibitoren, sowohl homomultivalente als auch heteromultivalente, zu konstruieren, werden Modellsysteme benötigt, die eine Anbringung verschiedener Liganden an ein Gerüst erlauben. DNA bietet durch ihre einzigartigen Eigenschaften (hohe Löslichkeit und Persistenzlänge, vielseitige Möglichkeiten zur Modifikation und die präzise Anordnung und Orientierung von Liganden) ein ausgezeichnetes Gerüst für die Ligan­den­präsen­ta­tion und somit auch für die Konstruktion von Modellsystemen. DNA wurde bereits vielfach als Gerüst verwendet, um beispielsweise synthetische Antikörper, sogenannte *synbodies*, zu generieren,^{7, 17} Proteine zu binden oder sogar ihre Aktivität zu kontrollieren¹⁸⁻²³ aber auch als molekulares Lineal, um Proteinstrukturen zu untersuchen.^{6, 8, 24-26} DNA könnte allerdings auch verwendet werden, um grundsätzliche Fragestellungen multivalenter Wechselwirkungen zu untersuchen, die bislang noch nicht erforscht worden sind.

2 Stand der Forschung

2.1 Multivalenz

Die Natur nutzt multivalente Wechselwirkungen, um schwache Rezeptor/Ligand Bindungen zu stärken.¹⁰ Während kovalente Bindungen nur chemisch wieder gespalten werden können, können multivalente durch einfache Dissoziation wieder getrennt werden.²⁷ Solche Bindungen entstehen, wenn mindestens zwei Rezeptoren einer Einheit mit mindestens zwei Liganden einer anderen Einheit wechselwirken und zeichnen sich durch andere Eigenschaften als die einzelnen Bindungen, aus denen sie sich zusammensetzen, aus. Multivalente Wechselwirkungen besitzen meist eine höhere Affinität und Spezifität.

Die einfachste Variante der multivalenten Wechselwirkung ist die Interaktion zwischen einem bivalenten Rezeptor und einem bivalenten Liganden. Diese Bindung kann in vier unterschiedlichen Versionen vorliegen (Abbildung 1). Zum einen kann ein bivalenter Ligand, der zwei identische Liganden trägt, entweder zwei gleiche Rezeptoren, die miteinander verbunden sind (intrahomobivalent) oder zwei voneinander unabhängige Rezeptoren (interhomobivalent) miteinander verbinden. Unterscheiden sich die beiden Liganden und Rezeptoren untereinander, kommt es entweder zu einer intraheterobivalenten Bindung (Rezeptoren sind miteinander verbunden) oder zu einer interheterobivalenten Bindung (voneinander unabhängige Rezeptoren).^{10, 28}

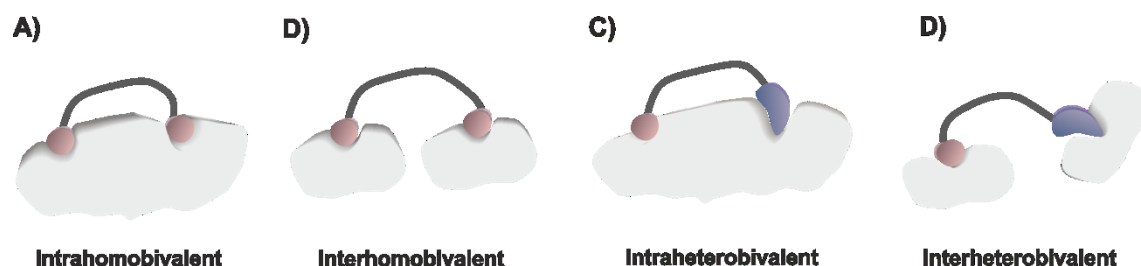


Abbildung 1: Verschiedene Bindungsvarianten bivalenter Liganden.

In der Natur werden multivalente Wechselwirkungen nicht nur genutzt um Affinitäten oder Spezifitäten zu erhöhen, sondern auch um eine Interaktion von großen Oberflächen zu vereinfachen.²⁹ Beispielsweise wird die Interaktion des Influenzavirus mit der Ober-

fläche einer Epithelzelle durch multivalente Effekte verstärkt.³⁰⁻³¹ Dabei interagieren mehrere Trimere des Hämagglutinins, die sich auf der Oberfläche des Virus befinden, mit mehreren Einheiten der *N*-Acetylneuraminsäure vieler Glycoproteine, die sich wiederum auf der Oberfläche der Zelle befinden. Auch die Wechselwirkung zwischen Neutrophilen und dem Endothel während des Entzündungsprozesses entsteht durch polyvalente Wechselwirkungen.¹⁰ Dabei wechselwirken mehrere E- und P- Selectine an der Oberfläche der Endothelzellen mit mehreren Glycoproteinen des Neutrophils. Multivalente Systeme können unter anderem für medizinische Zwecke^{10, 32} und in der Biochemie³³ genutzt werden. Dabei können Multirezeptorsignalkomplexe durch multivalente Systeme untersucht und somit aufgeklärt werden, wie die Rezeptoren untereinander kommunizieren. Sie finden weiterhin in der supramolekularen Chemie Anwendung, indem durch multivalente Wechselwirkungen eine definierte Konstruktion vieler Funktionsmoleküle möglich gemacht wird.³³ Obwohl bereits viele Studien zu multivalenten Verbindungen durchgeführt und auch viele derartige Systeme synthetisiert wurden, ist das Verständnis für eine solche Wechselwirkung nicht trivial. Während die Bindungsstärke monovalenter Wechselwirkungen hauptsächlich durch die Affinität der Binder zueinander abhängig ist, ist die Bindungsstärke multivalenter Bindungen zusätzlich von ihrer Valenz, von der Flexibilität des Linkers und auch von den Abständen der einzelnen Liganden abhängig.²⁸ Die freien Energien der einzelnen Wechselwirkungen können nicht einfach addiert werden. Bei der freien Bindungsenthalpie einer multivalenten Wechselwirkung

$$\Delta G_{Multi}^N = \Delta H_{Multi}^N - T\Delta S_{Multi}^N \quad (1)$$

muss bedacht werden, dass sich der enthalpische Beitrag (ΔH_{Multi}^N) aus den einzelnen Enthalpien der monovalenten Bindungen (ΔH_{Mono}^N) zusammensetzt und von weiteren auftretenden Interaktionen, wie der räumlichen Anordnung der Binder, deren Beschaffenheit und den intramolekularen Wechselwirkungen zwischen den Bindungseinheiten, abhängen kann. Diese Wechselwirkungen können entweder attraktiv ($\Delta H_{Multi}^N < \Delta H_{mono}^N$), repulsiv ($\Delta H_{Multi}^N > \Delta H_{mono}^N$), oder neutral ($\Delta H_{Multi}^N = \Delta H_{mono}^N$) sein. Eine attraktive Wechselwirkung begünstigt eine weitere Bindung. Bei einer repulsiven Wechselwirkung ist das Gegenteil der Fall und bei einer neutralen Wechselwirkung beeinflussen sich die Bindungen gegenseitig nicht.^{10, 27, 34} Der Entropiebeitrag der freien Bindungsenthalpie

(ΔG_{Multi}^0) setzt sich aus vier verschiedenen Beiträgen zusammen: der Translationsentropie (ΔS_{trans}), der Rotationsentropie (ΔS_{rot}), der Konformationsentropie (ΔS_{konf}) und der Solvatationsentropie (ΔS_{solv}):

$$\Delta S_{multi} = \Delta S_{trans} + \Delta S_{rot} + \Delta S_{konf} + \Delta S_{solv} \quad (2)$$

Die Änderung der Solvatationsentropie ist in den meisten Fällen deutlich geringer als die Änderungen der anderen Entropiebeiträge und wird deshalb oft vernachlässigt.¹⁰ Wenn gleiche Konzentrationen des Liganden und der Rezeptoren vorliegen, so ergibt sich näherungsweise der gleiche Wert für die Änderung der Translations- und Rotationsentropie für einen monovalenten und multivalenten Fall. Das bedeutet, dass multivalente Bindungen stark vom Beitrag der Änderung der Konformationsentropie (ΔS_{konf}) abhängig sind. Diese wiederum ist stark abhängig von dem Linker, der die einzelnen Liganden miteinander verknüpft. Länge, Flexibilität und die mögliche Ausbildung von attraktiven oder repulsiven Wechselwirkungen mit dem Rezeptor beeinflussen die multivalente Bindung.^{10, 27, 34-35} Somit können sich die Beiträge der Enthalpie und der Entropie in einem multivalenten System gegenseitig beeinflussen oder sogar aufheben. Beispielsweise können flexible Linker die Bindung von Liganden an Rezeptoren ohne sterische Hinderung gewährleisten, führen jedoch oft zu einem großen Verlust der konformationellen Entropie.²⁸ In manchen Fällen ist diese Flexibilität jedoch notwendig, damit die Liganden an die Rezeptoren binden können.³⁶ Der Gebrauch von rigiden Linkern, die eine optimale, komplementäre Anordnung zum Rezeptor besitzen, würden nach dieser Betrachtungsweise die höchsten Affinitäten hervorbringen.^{10, 34-35, 37-38}

Theoretische Modellsysteme, basierend auf der effektiven Konzentration (c_{eff}), sagen einen viel geringeren Verlust der Konformationsentropie bei der Verwendung von langen, flexiblen Linkern voraus.^{28, 39} Dieses Modell geht von einer *random-coil*-Struktur der Linker aus, die nicht alle Bewegungsfreiheitsgrade nach der Bindung verlieren. Die effektive Konzentration beschreibt die lokale Konzentration der Liganden in der Nähe der Rezeptoren und ist abhängig von der Länge der Linker. So lange zwei Liganden in einem bivalenten System beide Rezeptorbindungsstellen erreichen können, ist ein kürzerer Linker immer im Vorteil gegenüber einem langen Linker, da der kürzere einen geringeren

Verlust der Konformationsentropie verursacht. Anschaulich wird das in Abbildung 2 dargestellt.



Abbildung 2: Die effektive Ligandenkonzentration steigt mit der Linkerlänge. **A)** Optimale Linkerlänge führt zur Ausbildung von bivalenten Komplexen. **B)** Kurze Linkerlänge führt zwar zu einer hohen effektiven Konzentration, doch die Liganden können die Bindungstaschen nicht optimal erreichen. **C)** Zu lange Linker führen zu einer niedrigen effektiven Konzentration, aber beide Bindungstaschen können theoretisch gebunden werden.

Je kleiner der Raum ist, um den ein Ligand nach der ersten Bindung rotieren kann, umso größer ist die effektive Konzentration und umso geringer der Verlust der Konformationsentropie. Um die beiden Rezeptorstellen überhaupt binden zu können, darf der Linker nicht zu klein sein. Zu lange Linker führen demnach zu hohen Verlusten der Konformationsentropie. Auch nach diesem Modellsystem wäre der Gebrauch von rigiden Linkern mit optimalen Bindungsabständen von Vorteil. In der Praxis gestaltet sich dies manchmal als schwierig, da Bindungsabstände der Rezeptoren oftmals nicht genau vorhergesagt werden können. Deshalb werden häufig semirigide Linker verwendet, die einen gewissen Spielraum der Ligandenabstände zulassen.

Die theoretischen Betrachtungsweisen multivalenter Bindungen stellen die Grundlage für Chemiker dar, um multivalente Liganden zu konstruieren. Multivalente Bindungen wurden bereits oftmals genutzt um Signaltransduktionen oder Proteininteraktionen zu untersuchen.^{10, 28, 40-41} Durch eine räumliche Rasterung können Informationen über die Geometrie von Rezeptoren oder ihre Bindungsabstände erhalten werden.^{24, 26} Vielmals wurden Liganden in unterschiedlicher Anzahl auf Gerüsten präsentiert. Dendrimere werden beispielsweise oft als verzweigte Gerüste genutzt, auf denen 10-100 Liganden präsentiert werden können.⁴² Eine sehr hohe Anzahl an Liganden können mit Polymergerüsten, wie Polyacrylamid, in einem Molekül versammelt werden.⁴³ Lysosomen und Vesikel werden

2.1 Multivalenz

als sphärische Oberflächen für Liganden genutzt, um multivalente Bindungsstellen von Zellen und Viren zu imitieren.⁴⁴⁻⁴⁵ Bei diesen Systemen kann allerdings die genaue Anzahl an Liganden und der genaue Abstand nicht eingestellt werden. Der Gebrauch von DNA als Gerüst bietet demgegenüber den Vorteil, systematisch eine definierte Anzahl an Liganden mit genau einstellbaren Abständen und Orientierungen in vertretbarem synthetischem Aufwand anordnen zu können.

2.2 DNA als Gerüst

Die einzigartigen Eigenschaften der DNA erlauben vielfältige Einsatzmöglichkeiten. In der Natur liegt DNA meist in einer doppelhelikalen Struktur vor, wobei die beiden DNA-Einzelstränge antiparallel verlaufen. Die meist verbreitete Form der DNA stellt die B-DNA dar. Sie hat ein Durchmesser von 2 nm und eine helikale Periodizität von 10.5 Basenpaaren, was in etwa einer Länge von 3.5 nm entspricht. Die doppelhelikale DNA kann als ein rigider Stab mit einer Persistenzlänge von 50 nm angesehen werden. Im Vergleich dazu ist ein DNA-Einzelstrang mit einer Persistenzlänge von nur 1 nm sehr flexibel.⁴⁶ Diese Eigenschaften ermöglichen eine vielfältige Einstellung der Flexibilität bei der Verwendung von DNA als Gerüst. Falls eine sehr hohe Rigidität für eine Anwendung gebraucht wird, so liegt die Verwendung von komplett doppelsträngiger DNA nahe. Für flexible Gerüste können Einzelstrangbrüche oder ungepaarte Nukleotide in der DNA-Sequenz eingebaut werden.

Ein großer Vorteil gegenüber anderen Biopolymeren ist die Biokompatibilität der DNA. Durch Verwendung von DNA-Analoga, wie beispielsweise LNA (*locked nucleic acid*)⁴⁷ oder PNA (*peptide nucleic acid*)⁴⁸⁻⁴⁹ können Stabilitäten in biologischer Umgebung deutlich erhöht werden.

Modifikationen an DNA eröffneten ein breites Spektrum an Anwendungen.^{8, 18, 50-54} So können bereits Peptide,^{7, 55} Saccharide,⁵⁶ kleine organische Moleküle,²⁵ Fluoreszenzfarbstoffe⁵⁷ und vieles andere kovalent an DNA gebunden werden. Die Anzahl und die Orientierung dieser Modifikationen ist zudem kontrollierbar und kann meistens ohne großen synthetischen Aufwand variiert werden.

DNA kann auch genutzt werden, um Proteindomänen zu kolokalisieren. Dabei wird DNA als Gerüst für Proteindomänen-bindende Liganden verwendet. Die daraus resultierende erhöhte effektive Konzentration der Proteindomänen bei Bindung an den Ligand-DNA-Komplex kann beispielsweise die Assemblierung von Protein-Protein-Komplexen fördern oder die Effektivität von Enzymreaktionen steigern.¹⁸ Ein Beispiel einer solchen DNA-templierten Kontrolle von Proteinaktivität war die lokale Assoziation zweier Moleküle des grün fluoreszierenden Proteins EGFP von Demidov et al. im Jahr 2006.⁵⁸ Zunächst

erfolgte eine Biotinylierung der Proteine. Zwei Streptavidin-modifizierte DNA Stränge, die zueinander komplementär waren, wurden zu dem biotinylierten EGFP zugegeben. Dadurch erfolgte eine räumliche Annäherung der beiden EGFP, was in einer Erhöhung des Fluoreszenzsignals resultierte.

Erkelenz et al. zeigten, dass DNA als Gerüst verwendet werden kann, um ein einstellbares Monooxygenase-System zu konstruieren.²⁰ Dafür wurden zwei Subdomänen des Cytochrom P450 BM3-Enzyms, das BMR und das BMP, mit einem *HaloTag* versehen und somit eine Konjugation an eine Chlorohexan-modifizierte DNA möglich gemacht. Durch verschiedene DNA-Strukturen konnten die beiden Subdomänen in räumliche Nähe gebracht werden und somit eine DNA-Struktur-abhängige Reduktion von Cytochrom C beobachtet werden. Wurden die beiden Subdomänen durch die DNA-Struktur auseinandergehalten, konnte nur eine reduzierte oder gar keine Aktivität beobachtet werden. Wurden jedoch die beiden Subdomänen durch DNA räumlich aneinander gebracht, so erfolgte eine Reduktion von Cytochrom C.

Die Arbeitsgruppe von Willner präsentierte Glucose-Oxidase- (GOx) modifizierte DNA und Meerrettichperoxidase- (HRP) modifizierte DNA mehrfach auf einem langen, durch RCA (*rolling circle amplification*) synthetisierten, DNA-Strang.⁵⁹ Dadurch konnte eine Bienzym-Kaskade aktiviert werden. Die GOx-katalysierte Oxidation von Glucose lieferte Gluconsäure und Wasserstoffperoxid. Anschließend erfolgte eine HRP-katalysierte Oxidation von 2,2'-Azino-di[3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure] durch Wasserstoffperoxid. Diese Enzymkaskade konnte nicht ohne das DNA-Templat aktiviert werden.

Cissel et al. nutzten eine kovalente Methode, um zwei split-Luciferasen durch DNA in räumliche Nähe zu bringen.⁶⁰ Ein Bismaleinimid-Linker, ermöglichte eine Konjugation der Luciferase an eine Thiol-modifizierte DNA. Auch hier wurde durch Verwendung zweier komplementärer DNA-Stränge eine Proximitätserrhöhung induziert, was zu einem Anstieg der Lumineszenz führte.

Williams et al. nutzten DNA als Gerüst um synthetische *synbodies* zu generieren.^{7, 17} Zunächst wurden Peptide gesucht, welche an verschiedene Epitope des Proteins Gal80 (*galactose/lactose metabolism regulatory protein*) (Abbildung 3) binden. Diese Peptide wurden dann bivalent durch ein DNA-Gerüst präsentiert. Durch einen SPR-Assay (Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie) konnten verschiedene Abstände und Flexibilitäten

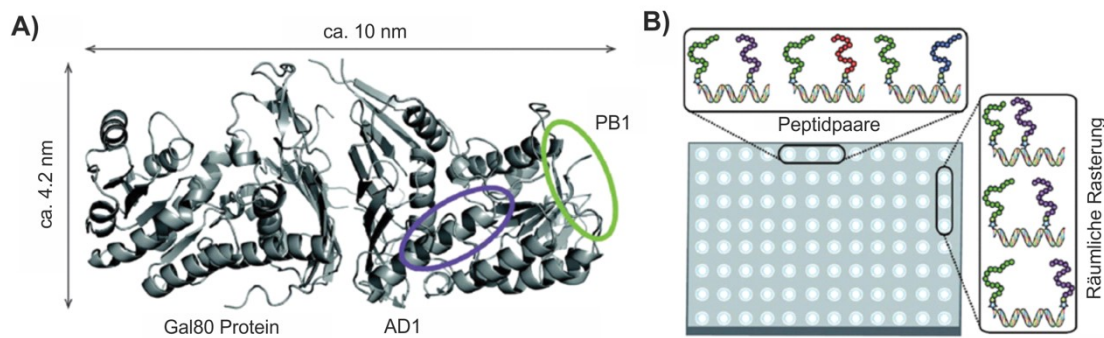


Abbildung 3: DNA als Gerüst zur bivalenten heterogenen Präsentation von Peptiden, die an Proteine binden. **A)** Gal80 und seine Bindungsdomänen. **B)** Kombinatorische Rasterung von verschiedenen Peptidsequenzen, Abständen und Flexibilitäten können dazu führen hochaffine Binder zu finden.⁷

getestet werden. Dadurch konnte ein *synbody* gefunden werden, der eine bis zu 1000fache größere Bindungsaffinität im Vergleich zu den monovalenten Analoga aufwies. In einer Folgestudie wurde derselbe Ansatz genutzt, um einen *synbody* für das Grb2 Protein zu finden. Erstaunlicherweise, zeigte dieser eine 5-10-fach bessere Affinität auf als kommerziell erhältliche Antikörper.

Die Arbeitsgruppe von Merckx entwickelte einen DNA-basierten bivalenten Liganden, der

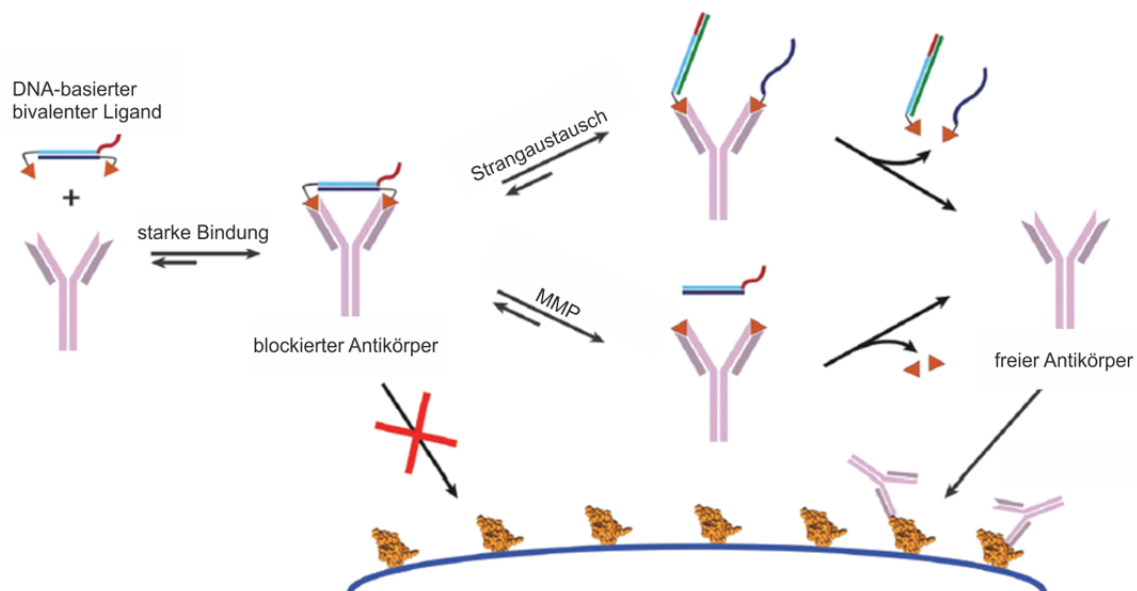


Abbildung 4: Bivalente Peptid-DNA-Konjugate als Antikörperblocker. Die bivalente Präsentation von den Antikörper-bindenden Peptiden führt zu einer starken Bindung. Der bivalente Peptid-DNA-Komplex kann auf zwei Arten wieder vom Antikörper getrennt werden: Entweder durch einen Strangaustausch oder durch Zugabe von MMP, welches die Bindung zwischen DNA und Peptid spaltet. Die monovalente Interaktion zwischen den Peptiden und dem Antikörper ist nun schwächer und der Antikörper wird wieder freigegeben.⁵

hoch-effektiv, nicht kovalent und reversibel an einen Antikörper bindet und somit als Antikörper-Blocker fungieren kann.^{5, 61} Hierfür wurde ein Peptid-Epitop an zwei komplementäre DNA-Einzelstränge konjugiert. Durch einen Überhang, konnte dieser DNA-Duplex durch die Zugabe eines längeren unmodifizierten Templats oder durch die Zugabe einer Matrix Metalloprotease (MMP) aufgebrochen werden. Die nun monovalenten Peptide hatten eine geringere Bindungsaffinität zum Antikörper, dissoziierten und gaben den Antikörper wieder frei (Abbildung 4).

Dix et. al. nutzten Ligand-modifizierte PNA/DNA- (L-PNA:DNA) und Ligand-modifizierte PNA/PNA-Assemblierungen (L-PNA:PNA), um die multivalenten Effekte bei der Ligandenbindung an einen GPCR-Rezeptor zu untersuchen.⁶² Bivalente L-PNA:DNA-Konstrukte zeigten eine signifikant höhere Affinität als ihre monovalenten Analoga auf. Weiterhin wurde untersucht, ob die GPCRs erst durch die Zugabe des bivalenten Liganden oder von alleine dimerisieren. Dafür wurden L-PNA:DNA- durch L-PNA:PNA-Konstrukte ausgetauscht, um die elektrostatische Repulsion der L-PNA:DNA-Konstrukte zu minimieren. Die Ergebnisse zeigten, dass bivalente Konstrukte simultan mit dem Dimer interagieren können und deuten darauf hin, dass GPCRs auch ohne die Zugabe von bivalenten Liganden in einem Dimer vorliegen können. Weiterhin konnten multivalente L-PNA:PNA Konstrukte höhergeordnete GPCR-Assemblierungen binden. Die Ergebnisse ergaben eine starke Affinitätserhöhung eines oktaivalenten Liganden, der auf das Vorhandensein einer höhergeordneten GPCR-Struktur hindeutete.

Abendroth et al. nutzten SERM (*Selective Estrogen Receptor Modulators*)-modifizierte DNA-Konjugate, um die Struktur des dimeren Östrogenrezeptors zu untersuchen.²⁵ Das bivalente Konstrukt mit einem Abstand von 7 nt zeigte eine 7-fach höhere Affinität als das monovalente Analogon. Weiterhin zeigte ein Konstrukt mit einem deutlich geringeren Abstand (3 nt) eine ebenfalls sehr hohe Affinität (5-fach stärker als das monovalente Konstrukt). Diese Ergebnisse deuten auf eine zweite hydrophobe Bindungsstelle des Rezeptors hin, welche bis dahin noch nicht bekannt war.

Paar et al. untersuchten mit Hilfe von DNA-Strukturen den Einfluss der strukturellen Beschränkungen der IgE-FcεRI-Rezeptorkomplexe.⁶³ Die Herstellung bivalenter DNP-modifizierter DNA ermöglichte die Konstruktion bivalenter Liganden mit definierten Abständen und Flexibilitäten, die in der Lage waren anti-DNP IgE zu verbrücken. Diese Komplexe wurden auf ihren Einfluss auf die zelluläre Signalgebung und die damit ver-

bundene zelluläre Degranulation untersucht. Während kurze Abstände der DNP-Liganden (44 und 51 Å) eine relativ hohe Signalantwort verursachten (etwa 30% von dem Signal, welches in der Zelle durch multivalente Antigene induziert wird), hat der Komplex mit einem Abstand von 68 Å zu einem geringeren Signal geführt und der Komplex mit der größten Abstand (102 Å) war nicht in der Lage eine Signalantwort und somit eine zelluläre Degranulation zu generieren. Nur durch eine Einführung von ungepaarten Segmenten und somit zu einer erhöhten Gerüstflexibilität, konnte eine Signalantwort durch den Rezeptor mit großen Abständen der DNP-Liganden induziert werden. Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass die hier verwendeten Liganden einen strukturellen Einfluss auf die Signalgebung induzieren können. Bivalente DNP-modifizierte DNA mit langen Abständen der DNP-Liganden, können die Rezeptoren in einem so großen Abstand halten, dass eine Signaltransduktion verhindert wird.

DNA kann nicht nur genutzt werden, um bestimmte Proteine oder Antikörper zu aktivieren oder zu blockieren, sondern auch, um strukturelle Eigenschaften von Proteinen zu untersuchen. Gängige Methoden, wie die Röntgenstrukturanalyse sind manchmal nicht zugänglich, da Proteine hydrolyseempfindlich sein können oder nicht kristallisiert werden können. Auch können Bindungsabstände im Kristall von denen in Lösung abweichen. Die

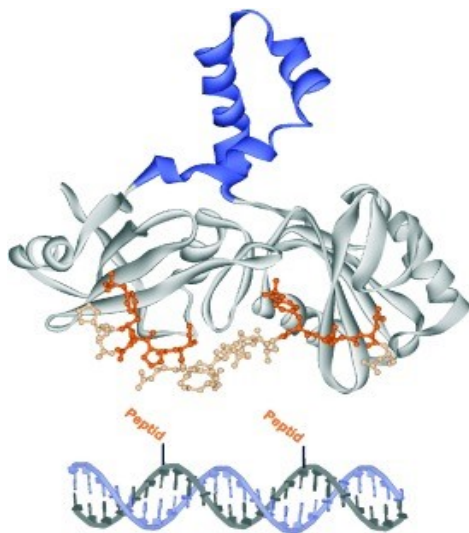


Abbildung 5: Oben: Kristallstruktur (PDB ID: 1A81) der Syk-tSH2 Domäne im Komplex mit einem bivalenten Phosphopeptid (blau: tSH2 Interdomäne; orange: Tetraphosphopeptidbindungsmotive; hellorange: Peptidlinker. Unten: Bivalente Präsentation von Phosphopeptiden an einem DNA-Doppelstrangkomplex.⁸

Nutzung von DNA als molekulares Lineal kann hierbei von Vorteil sein. Eberhard et al. untersuchten die Möglichkeit der Verwendung von DNA als molekulares Lineal und zeigten, dass diese Methode ähnliche Ergebnisse liefert wie die Röntgenstrukturanalyse.⁸ Hierbei verwendeten sie die Tandem SH2 Domäne der Syk-Kinase (Abbildung 5). Röntgenstrukturanalysen ergaben einen Abstand der Bindungstaschen von 34 Å. Für eine räumliche Rasterung wurden zwei Phosphopeptide an DNA in verschiedenen Abständen und mit verschiedenen Flexibilitäten angebracht. Die Ergebnisse zeigten die höchste Affinität eines bivalenten Konstrukts bei einem Abstand von 11 Nukleotiden, was in etwa 37 Å entspricht. Dies spiegelt

sehr gut die Daten der Röntgenkristallanalyse wieder. Auch flexible Systeme waren in der Lage an die SH2-Domäne zu binden, allerdings nur bis zu einem Anteil von 12-13 ungepaarten Nukleotiden im DNA-Doppelstrang.

Scheibe et al. nutzen Ligand-modifizierte PNA/DNA-Assemblierungen um die strukturellen Eigenschaften von *Erythria cristagalli lectin* (ECL) zu untersuchen.⁶⁴ Die Bindungsstellen des ECL sind bereits durch Röntgenstrukturanalysen gut charakterisiert. Diese sind 65 Å voneinander entfernt, befinden sich allerdings auf gegenüberliegenden Seiten des Proteins. Ein größerer Ligandenabstand und eine erhöhte Gerüstflexibilität stellen hierbei eine Notwendigkeit dar, damit beide Bindungsstellen erreicht werden können. Die Ergebnisse bestätigten die Röntgenkristallanalysen. Ein bivalentes Konstrukt welches beide Liganden in einem Abstand von ca. 100 Å präsentiert und welches durch Einzelstrangsegmente eine hohe Flexibilität aufwies, zeigte eine 33fach höhere Affinität im Vergleich zum monovalenten Analogon.

In einer anderen Studie zeigten Diezmann et al. ebenfalls, dass Peptid-DNA-Komplexe dazu verwendet werden können, den Abstand der Bindungsstellen von Proteinen zu bestimmen.⁶⁵⁻⁶⁶ In dieser Studie wurde das Adapter Protein 2 (AP2) untersucht. Dieses besteht aus einer Kerndomäne ($\mu 2$ und $\sigma 2$) und zwei Ohrdomänen (α und $\beta 2$). Jede der

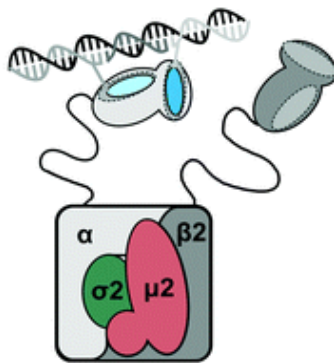


Abbildung 6: Bindung eines bivalenten Peptid-DNA Komplexes an das α -Ohr des Adapter-Proteins 2.⁶

Ohrdomänen beinhaltet zwei Bindungsstellen, die sogenannte *top-side* und *side-site*. Aus Kristallstrukturanalysen wurde ein Abstand der beiden Binder der Ohrdomänen von 40-45 Å bestimmt. Dieser Abstand konnte in dieser Studie mit einer räumlichen Rasterung mit bivalenten Peptid-DNA-Konstrukten bestätigt werden (Abbildung 6).⁶ Weiterhin zeigte das bivalente Konstrukt mit dem optimalen Abstand eine 10-fach größere Affinität, als das monovalente Analogon. Dadurch konnte erwiesen werden, dass die beiden Bindungsstellen am α -Ohr des Proteins synergistisch

interagieren können.

In einer Studie von Marczyne et al. wurde DNA als Gerüst verwendet, um selektive Binder für Tandem SH2-Domänen der Syk- und Zap70 Kinasen zu finden.⁶⁷ Da die Syk- und die ZAP70-Kinase die gleiche Konsensussequenz mit ähnlicher Aktivität bindet, ist

es nicht klar, wie eine differenzierte Aktivierung der beiden Kinasen erfolgt. Weiterhin ist es schwierig, selektive Binder für eine der beiden Kinasen zu entwickeln. In dieser Studie wurden ITAM-Motive verwendet, die beide Kinasen mit ähnlichen Aktivitäten binden. Diese wurden kovalent an DNA konjugiert und durch verschiedene DNA-Template konnten bivalente Liganden erhalten werden. Diese Arbeit zeigte, dass ZAP70 nur dann die Liganden affin bindet, wenn definierte Abstände und Orientierungen der ITAM-Motive vorliegen (verschiedene Orientierungen können durch entweder eine N-terminale oder C-terminale Anbringung an DNA erhalten werden). Syk hingegen erlaubt eine Bindung an Liganden mit verschiedenen Orientierungen und Abständen.

In den frühen 1980ern erkannten Seeman et al., dass durch die gut definierten räumlichen Dimensionen und die vorhersehbaren Watson-Crick Basenpaarungen, DNA als ein attraktiver Baustein für die Selbstassemblierung von nanometergroßen biomolekularen Strukturen genutzt werden kann.¹⁻² Der Ansatz basierte auf einer sogenannten *holiday-junction* (Abbildung 7 A), die durch vier Einzelstrang-DNA gebildet wurde. Durch *sticky-ends* (überhängende DNA-Einzelstränge) konnten durch Verwendung von komplementären Sequenzen dreidimensionale Strukturen gebildet werden. Dies erlaubte die Organisation von vielen vorhersagbaren Strukturen. Eine Limitierung stellt die Skalierbarkeit des Systems dar, da es mit zunehmender Größe vermehrt zu internen Fehlern bei der Selbstassemblierung führen kann.¹⁸

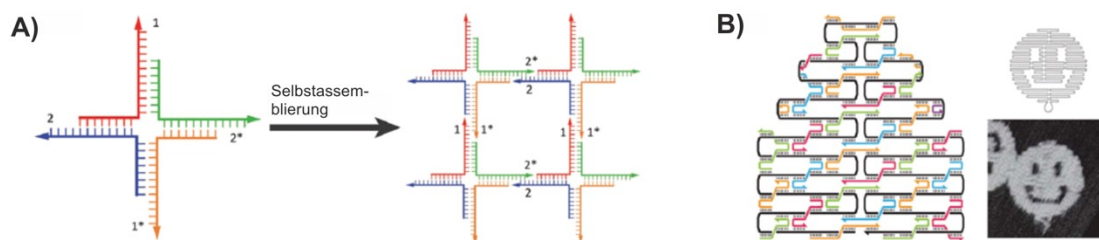


Abbildung 7: Erzeugung von mehrdimensionalen Strukturen mit DNA. **A)** Assemblierung von DNA zu einer *Holiday-Junction* mit *sticky-ends*, die mit weiteren *holiday-junctions* zweidimensionale Strukturen bilden kann.¹⁻² **B)** DNA-Origami wird durch ein langes Template und vielen kurzen *staple-strands* gebildet. Dadurch können sowohl zweidimensionale Strukturen wie Smileys als auch dreidimensionale Strukturen gebildet werden.³⁻⁴

Ein anderer Ansatz wurde 2006 von Rothemund et al. vorgestellt. Hierbei wurde ein langes DNA-Template als Gerüst verwendet und eine zweidimensionale Struktur gebildet, die von mehr als 200 *staple strands* (kurze DNA-Stränge) zusammengehalten wurde (Abbildung 7 B). Durch diesen Ansatz können sowohl zweidimensionale Anordnungen,

wie zum Beispiel Smileys als auch dreidimensionale Anordnungen verwirklicht werden.³⁻

4

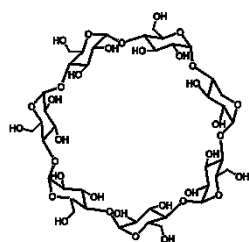
Chhabra et al. nutzten DNA-Origami, um Thrombin und PDGF (Plazentaler Wachstumsfaktor) auf nanometer große Strukturen anzuordnen.⁶⁸ In dieser Studie wurde gezeigt, dass Thrombin und PDGF selektiv an Aptamer-modifizierte Origami-Strukturen binden und somit unterschiedliche Anordnungen dieser Proteine realisiert werden können. Eine solche gezielte Anordnung von Proteinen kann beispielsweise für Studien in der Proteomik oder in der medizinischen Diagnostik genutzt werden.

In einer anderen Studie nutzten Huang et al. DNA-Origami Strukturen, um Ligand-Rezeptor-Interaktionen in Krebszellen zu untersuchen.⁶⁹ Dafür wurden DNA-Origami-Strukturen mit einem Integrin-Liganden und einem EGF-Liganden modifiziert und auf einer Oberfläche immobilisiert. In dieser Studie konnte eine Kooperativität zwischen Integrin und EGF bei der Ausbreitung von humanen Melanomzellen gezeigt werden.

2.3 Gast-Wirt-Wechselwirkungen

Gast-Wirt-Wechselwirkungen führen zu einem Inklusionskomplex zweier Moleküle, der durch nicht-kovalente Bindungen zusammengehalten wird. Sie können für die verschiedensten Anwendungen, wie für die chromatographische Aufreinigung⁷⁰, Katalyse,

A) β -Cyclodextrin



B) Cucurbit[7]uril

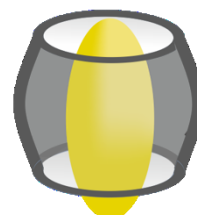
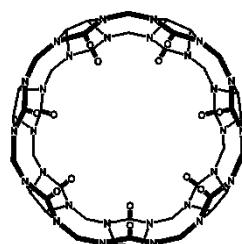


Abbildung 8: Chemische Strukturen (links) und schematische Darstellung der Inklusionskomplexe (rechts) von **A) β -Cyclodextrin** und **B) Cucurbit[7]uril**.

biomedizinische Anwendungen und für Polymerchemie, genutzt werden.⁷¹

Zu den in der Literatur am besten beschriebenen Käfigsystemen zählen die Cyclodextrine und Cucurbiturile.^{70, 72-82} Erstere bestehen aus 6, 7 oder 8 *D*-Glucose-Einheiten (α -, β -, und γ -Cyclodextrin), die jeweils durch α -1,4-glycosidische Bindungen miteinander verknüpft sind.^{73, 83} Die Anzahl der Glucoseeinheiten bestimmt die Größe ihres Hohlraums. Dieser ist hydrophob, da alle Hydroxylgruppen nach außen zeigen. Dadurch entsteht ein kleiner und ein größerer Hydroxylrand. Der letztere ist das Portal, durch das die Gast-Moleküle in den Käfig eindringen können. Daraus entsteht eine Struktur, die einem abgeschnittenen Kegel ähnelt (Abbildung 8 A).⁸⁴ Sie können mit einer Vielzahl an Gastmolekülen, wie Adamantan oder Rhodamin B, Komplexe ausbilden, sind gut wasserlöslich und leicht zu modifizieren. Die Bindungskonstanten, die mit Cyclodextrinen erzielt werden können, befinden sich meist im millimolaren bis submikromolaren Bereich,^{75, 85-86} was den Gebrauch von millimolaren Konzentrationen erfordert. Die besten Komplexbildungseigenschaften besitzt das β -Cyclodextrin (Abbildung 8 A), da das kleinere oder das größere Cyclodextrinanalogen (α - und γ -) oftmals entweder zu klein oder zu groß ist.⁸⁴ Cyclodextrine wurden bereits in der pharmazeutischen Industrie verwendet, um Pharmazeutika zu komplexieren, die dadurch eine bessere Löslichkeit und Bioverfügbarkeit er-

werben.⁷⁰ In der Lebensmittelbranche, der Tabakindustrie und der Kosmetikbranche wurden sie für das Entfernen von unerwünschten Geschmacksstoffen, mikrobakteriellen Kontaminationen und anderen unerwünschten Komponenten genutzt.⁷⁰

Analog zu den Cyclodextrinen sind auch Cucurbiturile aus einer variablen Anzahl an Untereinheiten aufgebaut. Statt Glucose bestehen diese jedoch aus Glycoluril-Molekülen, entweder 5, 6, 7, 8 oder 10,⁸⁷ die durch Methylenbrücken miteinander verbunden sind. Auch Cucurbiturile besitzen hydrophobe Innenräume, mit einem Volumen von 68-691 Å³ und können somit eine Vielzahl an hydrophoben Gastmolekülen mit unterschiedlichen Größen, meist mit sehr guter Selektivität, einschließen.^{84, 88-90} Die beiden Portale des Cucurbiturils, die aus Carbonylringen bestehen, sind im Gegensatz zu den unterschiedlichen Öffnungen im Cyclodextrin gleich groß. Das gibt dem Cucurbituril eine kürbisartige Struktur, wonach diese Molekülklasse auch benannt worden ist (Abbildung 8 B). Die Synthese der Cucurbiturile erfolgt durch eine Azid-katalysierte Kondensation von Glycoluril mit Formaldehyd.^{87, 91-93} Sie besitzen eine relativ schlechte Wasserlöslichkeit, jedoch wird dieser Nachteil durch die guten Bindungskonstanten bis in den attomolaren Bereich⁹⁴ zu vielen Gastmolekülen wieder aufgehoben, da deutlich geringere Konzentrationen für Messungen oder Anwendungen benötigt werden als beim Gebrauch von Cyclodextrinen. Das am meist verwendete Analogon ist das Cucurbit[7]uril (CB[7]), welches aus sieben Glycolurileinheiten besteht. Es ist groß genug, um viele Einschlusskomplexe bilden zu können und besitzt eine größere Wasserlöslichkeit (5 mM) als die größeren Analoga.⁸⁴ Weiterhin resultiert ein größerer hydrophober Effekt beim Einschluss von Gastmolekülen in den CB[7]-Käfig als bei den anderen Cucurbiturilen.⁸⁸ Es werden mehr Wassermoleküle aus dem Innenraum verdrängt als bei den kleineren Cucurbit[5]uril und Cucurbit[6]uril, was zu einem höheren Energiegewinn bei der Ausbildung von Inklusionskomplexen führt. Im Gegensatz zu den größeren Analoga, macht die Größe des Innenraums von CB[7] es den Wassermolekülen nicht möglich, sich in einer energetisch vorteilhaften Position anzuordnen. Dies erhöht den hydrophoben Effekt.^{88, 95} Die Carbonylringe an den Portalen eröffnen eine weitere Interaktionsstelle mit möglichen Gastmolekülen. Dort können Ion-Dipol-Wechselwirkungen ausgebildet werden, die die Gast-Wirt-Wechselwirkung zusätzlich stärken können.^{79, 95} Im Gegensatz zu den Cyclodextrinen, die moderate Bindungsaffinitäten ausbilden,^{89, 96} können Cucurbiturile sehr starke Inklusionskomplexe mit positiv geladenen Alkylaminen, Polyaminen (Spermin) und mit sym-

metrischen apolaren Molekülen, wie Adamantanderivaten,⁸¹⁻⁸² ausbilden. Ein Nachteil von Cucurbiturilen stellt die recht anspruchsvolle Modifikation des Käfigs dar. Die Anbringung einer funktionellen Gruppe an den Wirt ermöglicht jedoch einen größeren Anwendungsspielraum, denn dadurch können die Käfige beispielsweise an Oberflächen oder Biopolymere gebunden oder kovalent mit einem Fluorophor versehen werden. Vor wenigen Jahren wurde von Lucas et al. eine Route zur Monomodifizierung von Cucurbit[7]urilen beschrieben.⁹⁷ Dies eröffnete Möglichkeiten vielfältiger Anwendungen. Gong et al. nutzten die CB[7]-Adamantan Gast-Wirt-Komplexe, um die Ausbildung von SNA-RE-Vesikeln (*sensitive N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor*) zu untersuchen.⁹⁸ Dabei wurde CB[7] mit einem Cy3-Fluoreszenzfarbstoff und Adamantan mit einem Cy5-Fluoreszenzfarbstoff markiert. Beide Komponenten wurden separat in unterschiedliche Vesikel eingebracht und anschließend miteinander vermischt. Die Bindung des Gast-Wirt-Komplexes führte zu einem starken FRET-Effekt, wodurch die Vesikelbildung detektiert werden konnte.

Die supramolekulare Komplexierung von fluoreszenten Farbstoffen in makrozyklische Wirte kann die Fluoreszenzeigenschaften durch die veränderte Mikroumgebung beeinflussen.⁹⁹ Ein Beispiel hierfür stellt die Bindung von Anilinonaphthalensulfonaten (ANS) an Cyclodextrine dar. Anilinonaphthalensulfonate fluoreszieren in Lösung nur geringfügig. Werden sie jedoch vom Cyclodextrin gebunden, steigt die Fluoreszenz durch den hydrophoben Innenraum erheblich.^{72, 78} Auch für Cucurbiturile gibt es ähnliche Beispiele für eine Fluoreszenzerhöhung bei Bindung eines Fluorophors, wie Pyronin B und Cy5'. Nau et al. untersuchten die veränderten Eigenschaften der Komplexe bei Bindung an CB[7]. Pyronin B zeigte bei der Komplexierung mit CB[7] eine doppelt so hohe Helligkeit und Fluoreszenzlebensdauer und der Farbstoff Cy5' zeigte ebenfalls eine höhere Helligkeit und eine sogar um dreifach höhere Fluoreszenzlebensdauer auf.⁷⁸ Generell kann gesagt werden, dass bei der Komplexierung eines Farbstoffs in einen molekularen Käfig sowohl die Quantenausbeuten, als auch Fluoreszenzlebenszeiten und Photostabilitäten erhöht werden können, es zu spektralen Verschiebungen (Veränderung der Absorptions- um Emissionsmaxima) kommen kann und der Farbstoff vor Aggregation und vor externen Fluoreszenzlöschern geschützt wird.^{70, 78} Außerdem verhindert die Gast-Wirt-Komplexbildung die Selbstaggregation von Farbstoffen, die insbesondere bei hoher Konzentration der Farbstoffe FAM und Rhodamin B auftritt.⁷⁷ Die Fluoreszenzintensität bei

Komplexbildung wird zwar meist erhöht, es gibt allerdings auch Beispiele, bei denen diese erniedrigt wird. Hierzu zählt Rhodamin B. Die Bindung von Rhodamin B an CB[7], erhöht die Fluoreszenzintensität um etwa das Doppelte.⁷⁶ Wird dieser Farbstoff allerdings von β -Cyclodextrin gebunden, so erniedrigt sich dessen Fluoreszenzintensitätswert um etwa 30%.⁷⁴ Dieser Effekt eröffnet viele Anwendungsmöglichkeiten, wie beispielsweise die Bestimmung von Bindungskonstanten, wenn ein Farbstoff an den Liganden und der Käfig am Rezeptor gebunden ist.

2.4 Rezeptor-Oligomerisierung

Die Rezeptor-Oligomerisierung spielt eine wichtige Rolle in biologischen Prozessen. Rezeptoren können Signale aus der extrazellulären Umgebung an das Innere der Zelle weitergeben.¹⁰⁰ Äußere Stimuli kontrollieren Wachstum und Migration der Zelle, sowie Proliferation, Differenzierung und Apoptose.

Viele Rezeptoren interagieren mit Rezeptoren unter Bildung von Homodimeren oder bei Beteiligung anderer Rezeptoren unter Bildung von Heterodimeren. Auch eine Oligomerisierung zu Tetrameren oder auch zu Komplexen aus tausenden Rezeptoren ist möglich.¹⁰¹ Der Dimerisierung geht oft eine Konformationsänderung des Rezeptors voraus. Nachfolgend ermöglicht die Dimerisierung Modifikationen am Rezeptor, wie etwa die Phosphorylierung. Beispiele findet man bei G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCRs),¹⁰² Rezeptor-tyrosin-kinasen (RTKs)¹⁰³ und mehrkettigen Rezeptoren der Immunantwort (MIRR, *multichain immune response receptors*).³³ Als Beispiel für eine Heterodimerisierung soll hier eine Interaktion zwischen dem GABA-Rezeptor und einem Dopaminrezeptor in Neuronen genannt werden.³³ Durch zelltypspezifische Dimerisierungen und Oligomerisierungen können aus einer begrenzten Anzahl an Elementen viele verschiedene Antworten generiert werden.¹⁰⁴ Wenn viele zelluläre Prozesse also über Dimerisierungs- und Oligomerisierungsreaktionen gesteuert werden, ist es naheliegend, chemische Instrumente zu entwickeln, mit denen die Oligomerisierung ausgenutzt oder gesteuert werden kann. Hierfür können homo- oder heteromultivalente Wechselwirkungen genutzt werden.

Ein Beispiel für eine artifiziell hervorgerufene Dimerisierung stellt die sogenannte chemisch induzierte Dimerisierung (CID, *chemically-inducible dimerization*) dar.¹⁰⁵ Bei einem typischen CID-Experiment ist eine Komponente, das FRB, an die Membran gebunden. Die zweite Komponente, das FKBP (FK506- bindendes Protein), trägt das *protein of interest* (POI) und befindet sich im Cytoplasma. Wird nur ein Dimerisierungsreagenz (Rapamycin) hinzugegeben, welches beide Proteine, das FRB und das FKBP, miteinander verbindet, so wird ein ternärer Komplex gebildet und das POI wird an die Zielstelle gebracht. Dies ermöglicht die Untersuchung vieler Systeme. So erprobten Terrillon und Bouvier beispielsweise die Rolle von beta-Arrestin in der GPCR-Signalgebung.²³

2.5 Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor 2 (VEGFR2)

Die Krebs-Angiogenese stellt einen fundamentalen Prozess für das Krebswachstum dar, da durch die Ausbildung von neuen Blutgefäßen die Verbreitung von Sauerstoff und Nährstoffen ermöglicht wird. Dies ist die Voraussetzung für eine Vermehrung von Krebszellen und führt zu Metastasen.¹⁰⁶

Die VEGF-Familie, die aus VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D und PDGF (Plazentaler Wachstumsfaktor) besteht, ist eine Gruppe von Schlüsselproteinen, die im angiogenetischen Signalweg eine entscheidende Rolle spielen. Diese Proteine und die entsprechenden Rezeptoren werden in vielen Krebsarten überexprimiert.¹⁰⁷ Eine anhaltende VEGF-Expression führt zu einem Aufrechterhalten des vaskulären Netzwerks, was zum Tumorwachstum und der Ausbildung von Metastasen führt.¹⁰⁸ Die VEGF-Familie kann drei unterschiedliche Tyrosin-Kinasen (TK) Rezeptoren binden: den VEGFR1, den VEGFR2 und den VEGFR3. Der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktorrezeptor (VEGFR2) ist ein Tyrosin-kinase-rezeptor und wird auf endothelialen und auf innenverzweigten Knochenstammzellen exprimiert. Der VEGFR2 ist der Hauptmediator des VEGF-induzierten angiogenetischen Signalwegs.¹⁰⁸ Dieser Rezeptor besteht aus drei ver-

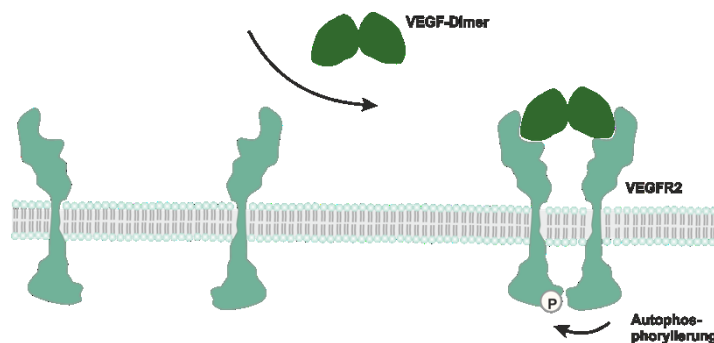


Abbildung 9: Dimerisierung des VEGFR2 durch einen VEGF-Dimer mit resultierender Autophosphorylierung.

schiedenen Untereinheiten: einer Ig-ähnlichen extrazellulären Domäne, einer hydrophoben transmembranen Region, die die TK-Region enthält und einem Carboxy-terminalen Schwanz. Dieser Rezeptor ist weiterhin in der Lage alle Isoformen des VEGF-A zu binden.¹⁰⁸ Bei der Bindung von VEGF-A an VEGFR2 wird eine Kaskade von mehreren Signalwegen induziert. Zunächst erfolgt eine Dimerisierung des VEGFR2 (Abbildung 9),

was zu einer Autophosphorylierung der intrazellulären TK-Domäne führt. Anschließend werden mehrere Signalwege aktiviert (die PLC- γ -, die MEK-MAP-Kinase und der PI3K-AKT Signalweg), was zu einer vermehrten Zellteilung und Migration von endothelialen Zellen führt.¹⁰⁸

2.5.1 Antagonisten für das VEGFR2

Biologische und präklinische Studien zeigten, dass eine antagonistische Bindung des VEGFR2 eine vielversprechende Strategie darstellt, um die Tumor-induzierte Angiogenese zu inhibieren.¹⁰⁹⁻¹¹⁰ Ramucirumab, ein monoklonaler Antikörper (mAb), bindet selektiv an VEGFR2 und inhibiert somit die VEGFR2-induzierten Signalwege.^{108, 111-113} Antikörper jedoch weisen einige Nachteile gegenüber kleinen Molekülen auf.¹¹⁴ Sie sind meist schwer herzustellen, relativ teuer, besitzen eine große molekulare Masse (ca. 150 kDa) und werden deshalb nicht so gut im Organismus transportiert, was zu einer limitierten Tumorpenetration führt.¹¹⁵ Weiterhin können Antikörper Immunreaktionen hervorrufen,¹¹⁵ falls der Antikörper nicht vollkommen humanisiert ist.¹¹⁶ Auch viele kleine Moleküle (Sorafenib¹¹⁷, Apatinib¹¹⁸) können VEGFR2 binden, zeigen jedoch meist eine geringe Selektivität. Auch Peptide und Peptidmimetika wurden bereits als Antagonisten untersucht.^{114, 119-120} Das Heptapeptid ATWLPPR, welches durch Phagendisplay gefunden wurde, kann sowohl VEGFR1 als auch VEGFR2 mit Affinitäten im μ M-Bereich binden.¹²¹⁻¹²² Auch ein VEGF-Peptid-Mimetikum, welches mit einer Affinität von 10-50 nM an VEGFR2 bindet, wurde in der Literatur beschrieben.¹¹⁴ Die Arbeitsgruppe von Kodadek beschrieben 2008 ein bivalentes Peptoid, welches mit einer sehr hohen Affinität (20-30 nM) an VEGFR2 bindet. Peptoide bieten den Vorteil gegenüber Peptiden, dass diese eine höhere Stabilität gegenüber Peptidasen und Proteasen besitzen.¹²³ In dieser Arbeit wurden zunächst zwei Peptoide GU40E und GU40C (Abbildung 10) durch ein Screening

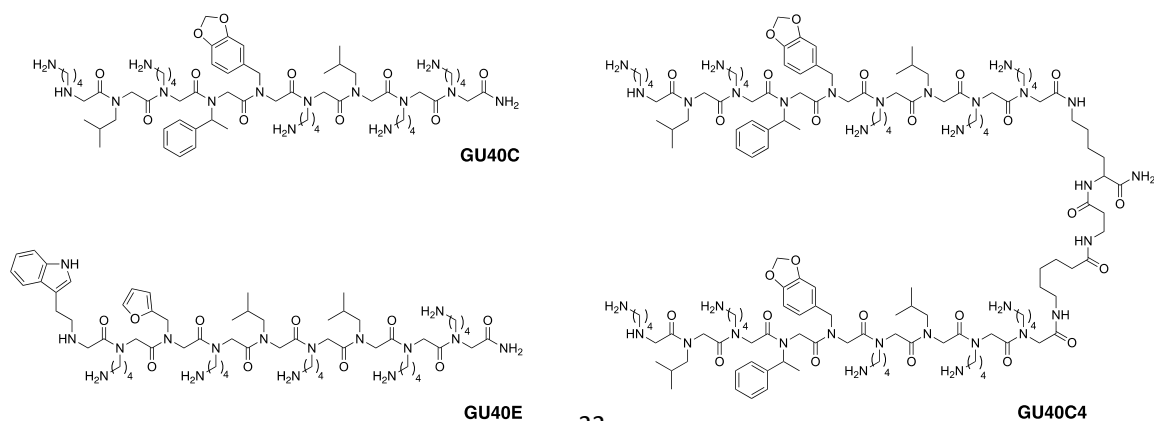


Abbildung 10: Chemische Strukturen der Peptoide GU40C, GU40E und des Homodimers GU40C4.

gefunden, welche mit einer Affinität von $2\ \mu\text{M}$ an den VEGFR2 binden. Da VEGF bereits als Dimer vorliegt, liegt es daher nahe, einen VEGFR2-Binder ebenfalls als Dimer zu konzipieren. Das Peptoid GU40C wurde mit verschiedenen langen peptidischen Linkern homodimerisiert und getestet. Das beste Ergebnis lieferte das Peptoid GU40C4 (Abbildung 10), welches den VEGFR2 90fach stärker bindet als das monovalente Peptoid. GU40C4 war in der Lage VEGF-induzierte HUVEC-Proliferation mit einem IC_{50} -Wert von $1\ \mu\text{M}$ zu inhibieren. Die Affinität für VEGFR2 entspricht etwa der Affinität monoklonaler Antikörper.¹²⁴⁻¹²⁵ In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass ein bivalentes Peptoid in der Lage ist, die VEGF-induzierte VEGFR2 Aktivität in vitro und in vivo zu inhibieren.¹¹⁴

2.6 $\alpha_v\beta_3$ -Integrin

2.6.1 Struktur von $\alpha_v\beta_3$ -Integrin

Integrine sind heterodimere Transmembran-Rezeptoren der extrazellulären Matrix und verbrücken das intrazelluläre Aktin-Cytoskelett mit der zellulären Umgebung.¹²⁶ Die alpha- und beta-Untereinheiten des Integrin-Heterodimers sind Typ1-Membranproteine (N-Terminus ist extrazellulär) und besitzen üblicherweise eine große extrazelluläre und eine kleine intrazelluläre Domäne, die durch eine einzelne Intermembrandomäne miteinander verbunden sind. Die verschiedenen Kombinationen der 18 alpha- und acht beta-Untereinheiten ergeben die bisher bekannten 24 unterschiedlichen Integrine bei Säugern. Sie können Proliferation, Apoptose und die Differenzierung in der Zellmigration kontrollieren. Weiterhin besitzen sie Schlüsselrollen in der Zellentwicklung, Immunantwort und in der Entwicklung von Krankheiten, unter anderem auch Krebs.¹²⁶ Integrine können eine inaktive und eine aktive Konformation einnehmen. Als Beispiel soll hier das $\alpha_v\beta_3$ -Integrin näher erläutert werden. Die Transmembranregionen der α_v - und β_3 -Untereinheit sind in der inaktiven Form der Integrins miteinander verbunden. Durch die Bindung von Talin, einem Cytoskelett-Protein, an die cytoplasmatische β_3 -Untereinheit der Integrins, erfolgt eine Trennung der α_v - und β_3 -Transmembran-Untereinheit und folglich eine Aktivierung des Integrins. Dabei erfolgt eine konformationelle Änderung des Integrins an der extrazellulären Seite und ermöglicht die Bindung eines Liganden an den Rezeptor (*inside-out*

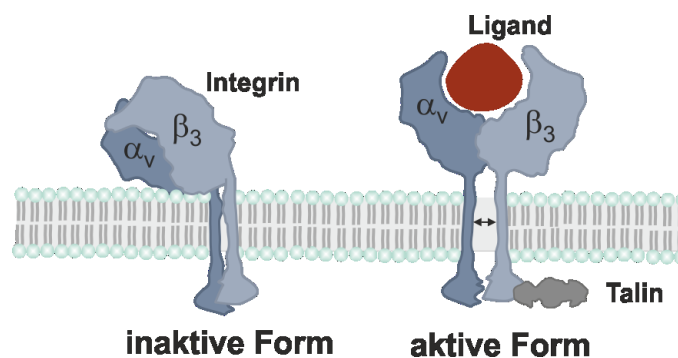


Abbildung 11: Die verschiedenen Konformationen des Integrins. Links: Inaktive Form. Das Integrin kann nicht oder nur kaum Liganden binden. Rechts: Aktive Form. Das Integrin ist in der Lage Liganden zu binden. (*signalling*) (Abbildung 11).¹²⁷⁻¹³⁰

Der angiogenetische Prozess ist von der Migration und der Invasion von endothelialen Zellen abhängig. Dies wird von den Zelladhäsionsrezeptoren, wie den Integrinen, reguliert.¹³¹⁻¹³² Während der Tumor-vermittelten Angiogenese binden die invasiven endothelialen Zellen durch das Integrin an Proteine der extrazellulären Matrix (ECM), wie Vitronectin und Fibronectin.¹³³ Eine Inhibition dieser Interaktion könnte auch zu einer Inhibition der Krebs-Angiogenese führen. Das folgende Kapitel beschreibt einige Antagonisten für das $\alpha_v\beta_3$ -Integrin.

2.6.2 Antagonisten für das $\alpha_v\beta_3$ -Integrin

Die RGD-Sequenz kommt mehr als 400 Mal in allen bisher bekannten Proteinen vor und stellt die Erkennungssequenz vieler Adhäsionsproteine dar.¹³⁴ Sie wurde als essentielles Bindungsmotiv für sieben von 24 Integrinen identifiziert und stellte den Startpunkt für die Entwicklung vieler Antagonisten für das $\alpha_v\beta_3$ -Integrin dar.¹³⁵ Lineare Peptide, die das RGD-Motiv beinhalten, sind weder selektiv gegenüber verschiedenen Integrin-Subtypen noch metabolisch besonders stabil.¹³⁶⁻¹³⁷ Dieses Problem wird bei cyclischen Peptiden

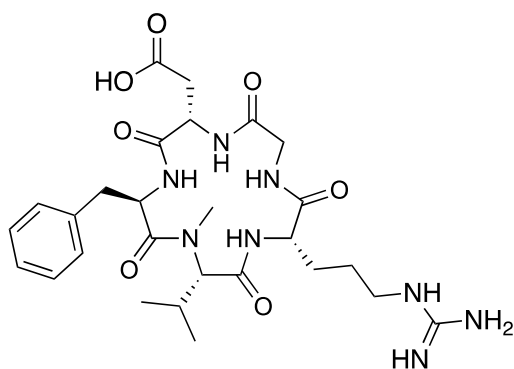


Abbildung 12: Chemische Struktur von Cilengitid (*cyclo*(RGDf(NMe)V).

durch die räumliche Orientierung der Aminosäurereste umgangen. Das cyclische Peptid *cyclo*(RGDfV) wurde durch ein Screening entdeckt und zeigt eine hohe Selektivität und Aktivität gegenüber $\alpha_v\beta_3$ -Integrin.¹³⁸ Eine weitere Optimierung durch eine Methylierung des Peptidrückgrats, brachte das Cilengitid *cyclo*(RGDfN(Me)V) (Abbildung 12) hervor, welches bereits in klinischen Studien erprobt wurde.¹³⁹

Die Methylierung erhöht Affinität und Selektivität für $\alpha_v\beta_3$ -Integrin. Weiterhin führt die Methylierung zu Vorteilen für die pharmakologischen Eigenschaften, da es weniger anfällig gegenüber Peptidasen und Proteasen ist.¹⁴⁰⁻¹⁴¹ Das Cilengitid besitzt eine subnanomolare Affinität und höhere Selektivität für $\alpha_v\beta_3$ -Integrin als andere untersuchte methylierte cyclische Pentapeptide. Es zeigt eine um etwa 1000fach höhere Affinität für $\alpha_v\beta_3$ -Integrin als für $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Integrin auf.¹³⁹ Die Substitution von Valin durch Lysin erlaubt

weiterhin Modifikationen mit prosthetischen Gruppen, Chelaten und Farbstoffen.¹⁴² Es konnte bereits gezeigt werden, dass dieses Cyclopeptid ein potenter Inhibitor der Angiogenese ist und die Apoptose von wachsenden endothelialen Zellen induziert, indem es die Interaktion zwischen dem $\alpha_v\beta_3$ -Integrin und der ECM inhibiert.¹⁴³⁻¹⁴⁴ Weiterhin zeigte es anti-angiogenetische und anti-Tumor Aktivitäten in vielen Tiermodellen.¹⁴⁵⁻¹⁴⁷ Allerdings zeigten auch Studien, dass geringe nanomolare Konzentrationen an Cilengitid das Tumorstadium *in vivo* stimulieren können.¹⁴⁸ Dies könnte auch der Grund sein, warum Cilengitid die klinischen Studien in Phase III nicht bestand.

Thumshin und Mitarbeiter synthetisierten ebenfalls multimeren cyclischen RGD-Peptide und untersuchten neben den Affinitäten auch den Einfluss des Abstands der einzelnen Liganden, indem sie unterschiedliche Linkerlängen benutzten. Die Ergebnisse zeigten, dass längere Linker zu höheren Affinitäten führen.¹⁴⁹ Das bedeutet, dass nicht nur die Anzahl der Liganden, sondern auch ihre räumliche Anordnung die Bindungsstärke eines multivalenten Antagonisten bestimmt.

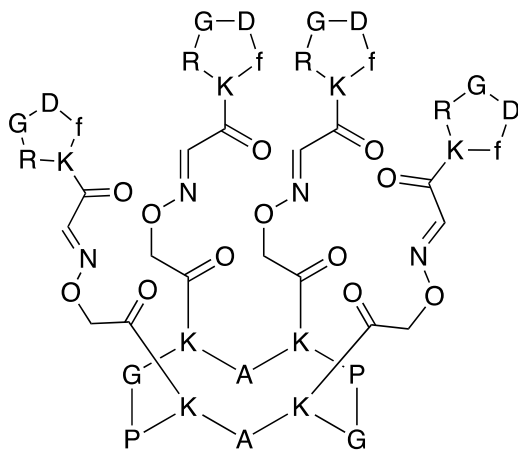


Abbildung 13: Chemische Struktur eines tetra-valenten RGD-Liganden.

Cyclopeptid erlaubten (Abbildung 13). Es konnte gezeigt werden, dass das tetramere Konstrukt eine höhere Affinität als das monomere Analogon hat.

Englund et al. nutzten modifizierte PNA/DNA-Assemblierungen, um einen multivalenten Antagonisten für $\alpha_v\beta_3$ -Integrin zu konstruieren.¹⁵¹ Modifizierung der PNA mit cyclischen RGD-Sequenzen (c(RGDfK)) und anschließender Assemblierung mit passender DNA führten zu einem System, bei dem sowohl die Ligandendichte als auch die Ligandennummer und die dreidimensionale Anordnung der Liganden präzise einstellbar waren.

Die Verwendung von multivalenten Liganden verspricht höhere Affinitäten gegenüber $\alpha_v\beta_3$ -Integrin, da der Rezeptor multimolekulare Anordnungen auf der Oberfläche der Zelle bildet. Garanger et al. zeigten eine erhöhte Affinität eines multivalenten Antagonisten im Vergleich zu dem monomeren Analogon.¹⁵⁰ Eine multivalente Anordnung von Antagonisten erfolgte auf einem cyclischen Decapeptid, welches vier Lysine beinhaltet, die die Modifikation mit jeweils einem cyclischen RGD-enthaltenden

2.6 $\alpha_v\beta_3$ -Integrin

Der Komplex mit der höchsten Inhibitionsrate beinhaltete 15 cyclische RGD-Sequenzen und war um zwei Größenordnungen potenter, als die cyclische RGD-Sequenz (c(RGDfK)) alleine.

2.7 Interaktion zwischen VEGFR2 und $\alpha_v\beta_3$ -Integrin

Eine Interaktion zwischen $\alpha_v\beta_3$ -Integrin und VEGFR2 wurde bereits in der Literatur mehrfach beschrieben.^{9, 133, 152-155} Es konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung des VEGFR2 erhöht war, wenn endotheliale Zellen auf Oberflächen, die mit Vitronectin oder Fibrinogen (Liganden für das Integrin) beschichtet waren, plattiert wurden.¹⁵⁶ Die Interaktion zwischen VEGFR2 und der β_3 -Untereinheit von $\alpha_v\beta_3$ -Integrinen findet nur zwischen der extrazellulären β_3 -Untereinheit und dem Rezeptor statt. Eine Interaktion zwischen β_1 -Untereinheiten oder β_5 -Untereinheiten von Integrinen und dem VEGFR2 konnte nicht beobachtet werden. Weiterhin interagiert nur die aktive Form von β_3 mit dem VEGFR2 und zeigt somit einen funktionellen *crossstalk* zwischen den beiden Rezeptoren.¹³³ Die α_v -Untereinheit verstärkt weiterhin die Interaktion zwischen der β_3 -Untereinheit und dem VEGFR2.⁹ Ein Beweis für die Interaktion zwischen den beiden Rezeptoren konnte erbracht werden, als gezeigt wurde, dass bei einer Stimulation von VEGF nicht nur VEGFR2 phosphoryliert wurde, sondern auch $\alpha_v\beta_3$ -Integrin. Weiterhin

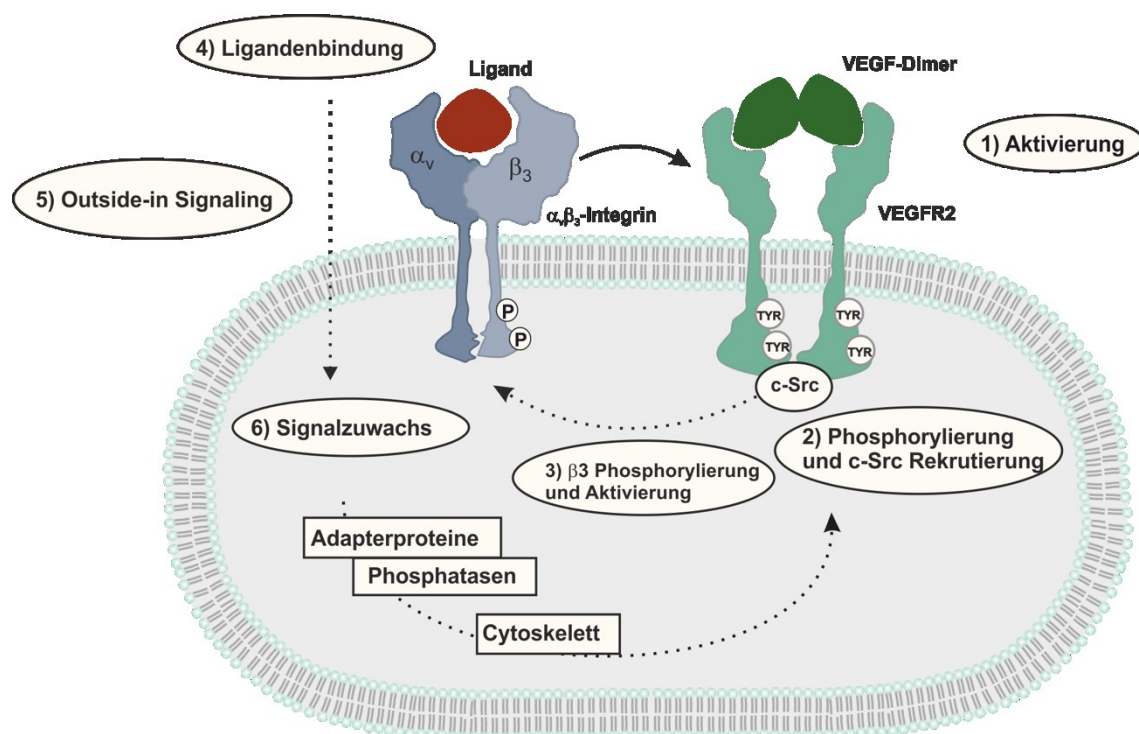


Abbildung 14: Möglicher Interaktionsmechanismus zwischen VEGFR2 und $\alpha_v\beta_3$ -Integrin. Ein VEGF-Dimer bindet an das VEGFR2, dimerisiert und aktiviert den Rezeptor. Das führt zu einer Phosphorylierung und Aktivierung von c-Src, welcher wiederum die β_3 -Domäne des Integrins phosphorylieren kann. Das aktivierte $\alpha_v\beta_3$ -Integrin bindet einen Liganden in der extrazellulären Matrix, was zu einem *outside-in signaling* und zu einem Signalwachstum innerhalb der Zelle führt. Dieser Signalzuwachs kann weiterhin zu einer Aktivierung des VEGFR2 führen.⁹

zeigten nur die stimulierten Zellen mit VEGF eine Interaktion zwischen den beiden Rezeptoren.¹⁵³ Es gibt viele vorgeschlagene Mechanismen für die Interaktion zwischen $\alpha_v\beta_3$ -Integrin und VEGFR2. Allerdings ist die Abfolge der einzelnen Schritte und ob die Komplexbildung vor oder nach der Bindung von VEGF an VEGFR2 erfolgt noch nicht geklärt. Einen möglichen Mechanismus zeigt Abbildung 14. Zunächst bindet ein VEGF-Dimer an den VEGFR2-Rezeptor und dimerisiert diesen. Dies führt zur Aktivierung und Phosphorylierung des Rezeptors. Folglich wird c-Src rekrutiert, welches die β_3 -Integrin-Domäne phosphoryliert. Der aktivierte $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Rezeptor kann nun Liganden binden, was zu einer Signalgebung von außen nach innen führt (*outside-in-signalling*). Es folgt ein Signalzuwachs, der unter anderem Adapterproteine und Phosphatasen aktiviert, was wiederum zu einer Phosphorylierung des VEGFR2-Rezeptors und zur Rekrutierung von c-Src führt.⁹

In der Literatur wurde bereits ein dual-spezifischer Binder, der sowohl das VEGFR2 als auch das $\alpha_v\beta_3$ -Integrin binden kann, beschrieben. Dieser bestand aus einem dimeren VEGF, wobei die beiden VEGF durch 14 Aminosäure-Linker verbunden waren. In einem Loop des VEGF's wurde eine RGD-Sequenz eingebracht, die das $\alpha_v\beta_3$ -Integrin binden konnte. Dieser bispezifische Binder konnte deutlich stärker an Zellen, die beide Rezeptoren überexprimieren, binden. Weiterhin führte der dual-spezifische Binder zu deutlich niedrigeren Phosphorylierungsraten des VEGFR2-Rezeptors.¹⁵⁴

3 Zielstellung

Multivalenz kann eine Komplexbildung vereinfachen, wenn die monovalenten Interaktionspartner nur schwache Bindungsaffinitäten aufweisen. Allerdings müssen bimolekulare Bindungsweisen auch umgangen werden können, wenn multimolekulare Strukturen ausgebildet werden sollen.

A) Bimolekular vs. Multimolekular



B) Bindungsabstand



C) Bindungsstärke



D) Flexibilität



Abbildung 15: Modellsystem zur Untersuchung der Grenzen der Bivalenz. **A)** Bivalente Binder können bimolekular oder multimolekular binden. **B)** Eine mögliche Abhängigkeit des bivalenten Effekts von der monovalenten Interaktionsstärke ist noch nicht untersucht worden. **C)** Eine Variation der Gerüstflexibilität von bivalenten Systemen könnte einen Einfluss auf den bivalenten Effekt haben. **D)** Monovalente Binder haben eine geringere Bindungsaffinität als bivalente Binder. Wie sich jedoch die Bindungsaffinität bei großen Abständen verhält, ist noch nicht bekannt.

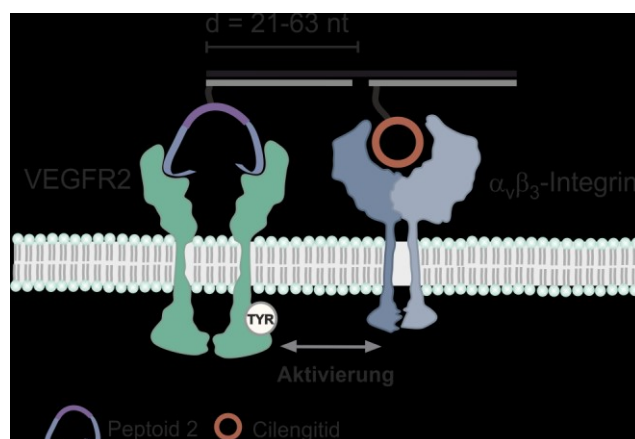
In dieser Arbeit soll untersucht werden, unter welchen Umständen ein bivalentes System bimolekulare oder multimolekulare Strukturen ausbildet (Abbildung 15 A). Eine Untersuchung der Reichweite der Bivalenz könnte helfen, fundamentale Grundlagen bivalenter Systeme zu erklären und könnte bei der Planung künftiger bivalenter Binder berücksichtigt werden. Weiterhin könnten multivalente Interaktionen in der Natur besser verstanden werden. Zunächst sollte geprüft werden, unter welchen Umständen bivalente Binder von keiner bivalenten Verstärkung mehr profitieren und ob dann multimolekulare Bindungs-

weisen ermöglicht werden. Hierbei sollten folgende Faktoren Gegenstand der Untersuchung sein:

- I. Abstand der Liganden/Rezeptor-Module (Abbildung 15 B)
- II. Stärke der monovalenten Interaktionspartner (Abbildung 15 C)
- III. Flexibilität des Gerüsts (Abbildung 15 D)

Als Modellsystem sollten Gast-Wirt-Komplexe genutzt werden, die an DNA konjugiert sind. DNA als Gerüst bietet dabei viele Vorteile, wie beispielsweise eine hohe Persistenzlänge, sehr gute Löslichkeit in Wasser und die Möglichkeit der kontrollierten Anordnung und Valenz der Liganden. Auch die Flexibilität des DNA-Gerüsts kann bei Doppelsträngen relativ einfach eingestellt werden, indem ungepaarte Nukleotide oder Doppelstrangbrüche eingebaut werden. Gast-Wirt Systeme eignen sich wiederum sehr gut als Ligand-Rezeptor-Paare, da sie meist nicht mit der DNA interagieren¹⁵⁷ und durch die Wahl verschiedener Gastmoleküle kann die monovalente Interaktionsstärke variiert werden. Die kovalente Verknüpfung der Wirte und Gäste an DNA ermöglicht eine bivalente Präsentation der Rezeptoren und Liganden in verschiedenen Abständen. Dabei müssen lediglich verschiedene Template verwendet werden, was den Synthesaufwand deutlich reduziert. Die Bestimmung der Affinitäten kann durch verschiedene fluoreszenzbasierende Assays erfolgen.

Der Bivalenzeffekt wurde bereits vielfach genutzt, um eine Bindungsverstärkung bei Bindung an beispielsweise einen Rezeptor zu erreichen.^{6, 21, 114} Heterobivalente Binder, die in der Lage sind, zwei Rezeptoren zu binden, hätten nicht nur den Vorteil der Affinitätsverstärkung, sondern könnten auch zu einer Erhöhung der Selektivität führen. Im vorangegangenen Kapitel wurden die beiden Rezeptoren $\alpha_v\beta_3$ -Integrin und VEGFR2 vorge-



stellt, durch deren Interaktion die Angiogenese eingeleitet wird. Beide Rezeptoren werden in Tumoren überexprimiert und stellen deshalb wichtige Zielobjekte in der Krebsforschung dar. Obwohl es bereits viele Therapeutika gibt, die entweder das $\alpha_v\beta_3$ -Integrin oder das VEGFR2 inhibieren können,

Abbildung 16: Bindung eines bispezifischen Binders an VEGFR2 und $\alpha_v\beta_3$ -Integrin.

ist der therapeutische Effekt meist gering. Ein Konstrukt, welches beide Rezeptoren inhibieren kann, ist in diesem Zusammenhang sehr interessant, weil es nicht nur zu höheren Affinitäten, sondern auch zu höheren Selektivitäten führen könnte. In diesem Teil der Arbeit soll ein bispezifisches Konstrukt synthetisiert werden, welches diese beiden Rezeptoren binden kann. Hierbei sollen das Cilengitid¹⁴⁷, ein Cyclopentapeptid, und die im Arbeitskreis von Kodadek entwickelten Peptide¹¹⁴ (**GU40C** und **GU40C4**) die Binder für die beiden Rezeptoren darstellen. Ziel ist es, die beiden Antagonisten kovalent an DNA anzubringen und durch Verwendung verschiedener Template diese in unterschiedlichen Abständen zu präsentieren (Abbildung 16). Die Messungen sollten mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops durchgeführt werden und als Zielobjekt soll hierbei die HUVEC-Zelllinie dienen, die beide Rezeptoren überexprimiert. Die Selektivität dieses Konstruktes soll durch eine Vergleichszelllinie (HEK293), die diese beiden Rezeptoren nicht überexprimiert, herausgearbeitet werden. Außerdem soll der Einfluss des bispezifischen Konstrukts auf die Phosphorylierung des VEGFR2 mittels eines ELISA-Assays untersucht werden. Dieser Ansatz soll die folgenden Fragestellungen beantworten:

- I. Binden bispezifischer Binder besser an die HUVEC-Zelllinie als monospezifische Binder?
- II. Ist ein bispezifischer Binder selektiver als ein monospezifischen Binder?
- III. Übt ein bispezifischer Binder einen Einfluss auf die VEGFR2-Phosphorylierung aus?

Durch diesen Ansatz könnte ein Beispiel für einen dual-spezifischen Antagonisten gegen $\alpha_v\beta_3$ -Integrin und VEGFR2 entwickelt werden, der deutlich affiner und selektiver bei der Bindung an Zellen, die beide Rezeptoren überexprimieren, sein könnte.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Untersuchungen zur Reichweite der Bivalenz

Multivalente Wechselwirkungen werden in der Natur genutzt, um schwache Rezeptor/Ligand-Wechselwirkungen zu verstärken. Bei solchen Wechselwirkungen interagieren multiple Liganden mit mehreren Rezeptoren und verstärken die Bindung. Dies stellt einen Vorteil dar, wenn die Bindung bei geringen Konzentrationen stattfinden soll. Der bivalente Effekt wurde bereits oftmals in der Forschung verwendet, um hochaffine Binder für schwache Proteinrezeptoren zu konstruieren, wenn diese zwei oder mehr Bindungsstellen besitzen.^{10, 27, 33, 158-159} Oft sind die Bindungsstellen weniger als 100 Å voneinander entfernt und der multivalente Effekt führt zu einer erheblichen Affinitätserhöhung. Einige biologische Erkennungsmotive sind weiter als 100 Å voneinander entfernt. Es ist jedoch nicht klar, ob eine multivalente Verstärkung auch bei größeren Abständen erzielt werden kann. In diesem Teil der Arbeit wird untersucht, ob die Reichweite der bivalenten Verstärkung begrenzt ist und falls, ja, wie diese von der Bindungsstärke des monovalenten Binders und der Flexibilität des Gerüsts abhängt.

Ein bivalenter Binder kann entweder bimolekular oder multimolekular an einen bivalenten Rezeptor binden. In der Natur gibt es einige Beispiele, wie Adapter Proteine,^{13, 65-66, 160-161} Intersektin,^{11, 162} oder Clathrin,^{13, 163-164} die eine verbrückende Funktion ausüben.

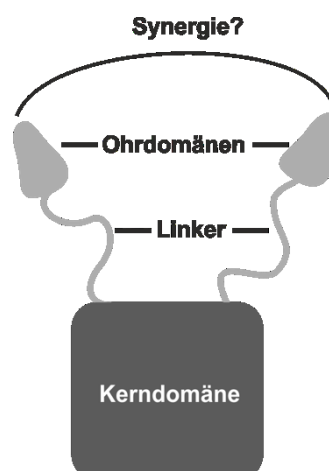


Abbildung 17: Schematische Darstellung des Adapter Proteins 2 (AP2), welches aus einer Kerndomäne und zwei Ohrdomänen, die durch lange, flexible Linker an die Kerndomäne gebunden sind, besteht.

Dies ermöglicht die Rekrutierung vieler Proteine an eine Stelle. Das AP2 (Abbildung 17) verbrückt die Clathrin-beschichteten Vesikel mit der Zellmembran durch spezifische Interaktionen.¹⁶⁰ Es besteht aus einer Kerndomäne und zwei Ohrdomänen, welche durch sehr lange und flexible Linker an die Kerndomäne gebunden sind. Hierbei stellt sich die Frage, ob die simultane Interaktion beider Ohrdomänen mit einem bivalenten Binder bei solch großen Abständen noch Bindungsverstärkungen ermöglichen kann und ob eine verbrückende Bindungsweise durch das mögliche Fehlen dieser Synergie erleichtert wird.

Die in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnisse beschreiben die erste systematische Studie, die die Grenze der Bivalenz untersucht. Sowohl die Reichweite der Bivalenz als auch die Bindungsweise (bimolekular oder multimolekular) wurde in Bezug auf den Bindungsabstand, die Bindungsstärke als auch die Flexibilität des Gerüsts untersucht.

4.1.1 Modellsystem zur Messung der Reichweite der Bivalenz

Für die Untersuchung der Reichweite der Bivalenz, wurde ein Modellsystem benötigt, mit dem sowohl der Bindungsabstand als auch die Bindungsstärke präzise und variabel eingestellt werden können.

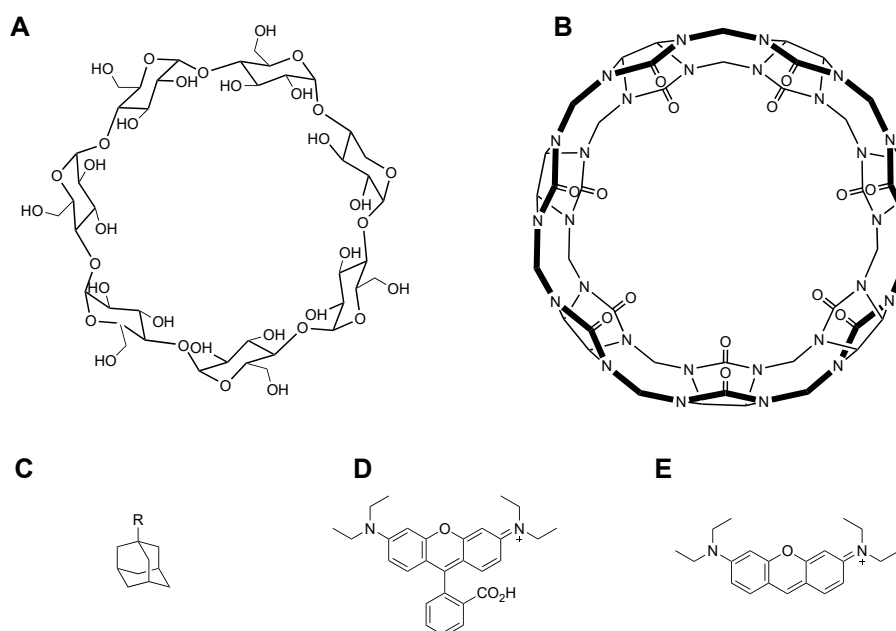


Abbildung 18: **A)** Strukturformel von β -Cyclodextrin. **B)** Strukturformel von Cucurbit[7]uril. **C)** Strukturformel von Adamantan. **D)** Strukturformel von Rhodamin B. **E)** Strukturformel von Pyronin B.

DNA stellt als Gerüst eine gute Wahl dar, da diese im Doppelstrang eine hohe Persistenzlänge¹⁶⁵ besitzt und sich relativ leicht modifizieren lässt. Abstände, Valenz und Orientierung der Liganden oder Rezeptoren an der DNA können genau eingestellt werden. Weiterhin kann die Flexibilität durch eingebaute Doppelstrangbrüche oder ungepaarte Nukleotide erhöht werden und die gute Löslichkeit der DNA in Wasser stellt einen weiteren Vorteil dar. Als Rezeptor-Ligand-Paar wurde ein System benötigt, welches nicht mit dem DNA-Gerüst interagiert. Gast-Wirt-Systeme stellen hierfür eine mögliche Wahl dar. Als Wirte wurden Cyclodextrine (Abbildung 18 A) oder Cucurbiturile (Abbildung 18 B) gewählt. Cyclodextrine können relativ einfach modifiziert werden und bilden moderate bis gute Gast-Wirt-Komplexe (im millimolaren oder mikromolaren Bereich) mit geeigneten Gastmolekülen aus.

Die Modifizierung von Cucurbiturilen ist synthetisch zwar anspruchsvoller, allerdings können sie Gast-Wirt-Komplexe mit außerordentlich starken Bindungsaffinitäten ausbilden. Als Gäste können für beide Wirte eine Vielzahl an Molekülen gewählt werden. Hierbei handelt es sich meist um apolare Moleküle, wie Adamantan (Abbildung 18 C). Auch viele fluoreszente Farbstoffe, wie Rhodamin B (Abbildung 18 D), Pyronin B (Abbildung 18 E), TAMRA oder Fluorescein können Gast-Wirt-Komplexe mit beiden Wirten ausbilden.^{73, 84, 88} Modifizierung von DNA mit Cyclodextrin oder Cucurbituril und

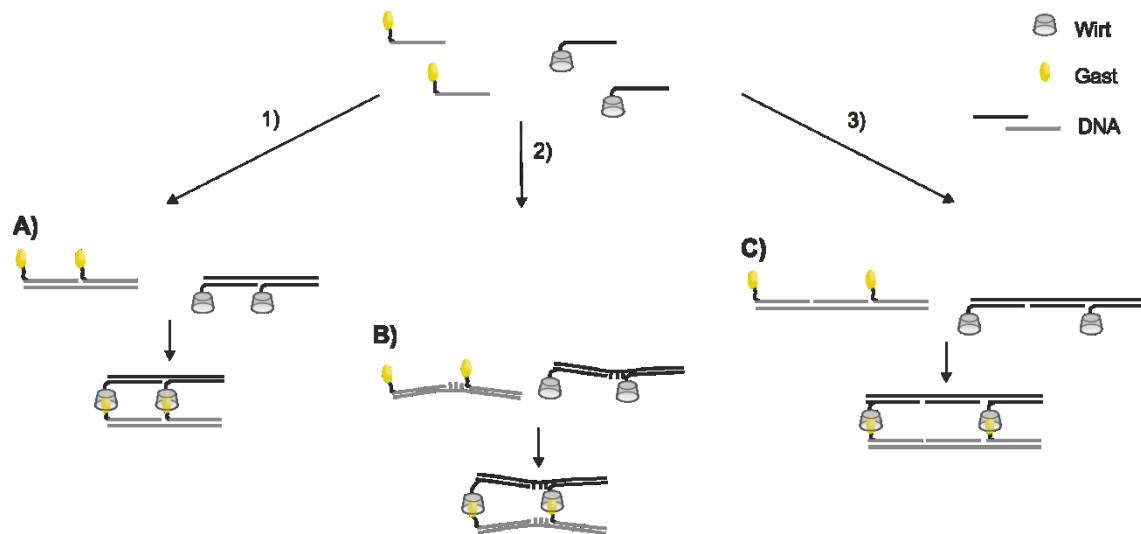


Abbildung 19: Schematische Darstellung der Bildung von Gast-Wirt-DNA-Komplexen. **A)** Durch Verwendung vollständig komplementärer Template, können rigide bivalente Komplexe hergestellt werden. **B)** Mehrere ungepaarte Nukleotide nach der Hybridisierung erlauben höhere Gerüstflexibilitäten. **C)** Durch Verwendung längerer Template und einem Templat, welches zwischen die modifizierten DNA Einzelstränge eingebracht werden kann („Versteifer“), können ohne zusätzlichen Synthesaufwand größere Abstände zwischen den Bindungspaares eingestellt werden. 1) Komplementäres Templat. 2) Ein nicht vollständig komplementäres Templat. 3) Ein langes komplementäres Templat und ein „Versteifer“.

einem passenden Gast stellt somit ein passendes Modellsystem dar, mit dem die Reichweite der Bivalenz untersucht werden kann. Dabei agiert DNA als Gerüst und molekulares Lineal und der Gast-Wirt-Komplex als Ligand-Rezeptor-Paar. Abbildung 19 zeigt schematisch, wie verschiedene bivalente Systeme durch Hybridisierung hergestellt werden können. Jeweils zwei unterschiedliche Sequenzen von Gast- bzw. Wirt-modifizierter DNA können bivalent dargestellt werden, indem vollständig komplementäre Template hinzugegeben werden (Abbildung 19 A). Die Flexibilität im System kann durch die Verwendung von längeren Templaten erreicht werden, die in der Mitte des bivalenten Systems ungepaarte Nukleotide hinterlassen (Abbildung 19 B). Weiterhin können größere Abstände durch Hybridisierung der modifizierten Stränge mit Templaten unterschiedli-

4.1 Untersuchungen zur Reichweite der Bivalenz

cher Länge eingestellt werden. Das System kann dann durch ein „Versteifer“ rigidifiziert werden (Abbildung 19 C).

4.1.2 Synthese der β -Cyclodextrin modifizierten DNA

β -Cyclodextrin-DNA-Konjugate wurden bereits mehrfach in der Literatur beschrieben und benutzt, um beispielsweise einzelne Nukleotid Polymorphismen zu visualisieren.¹⁶⁶⁻

¹⁶⁷ Eine mögliche Synthesestrategie solche Konjugate, stellt die Maleinimid-Thiol-Kupplung dar.¹⁶⁸ Dafür sollte DNA mit einem Thiol und des β -Cyclodextrins mit einem Maleinimid modifiziert werden.

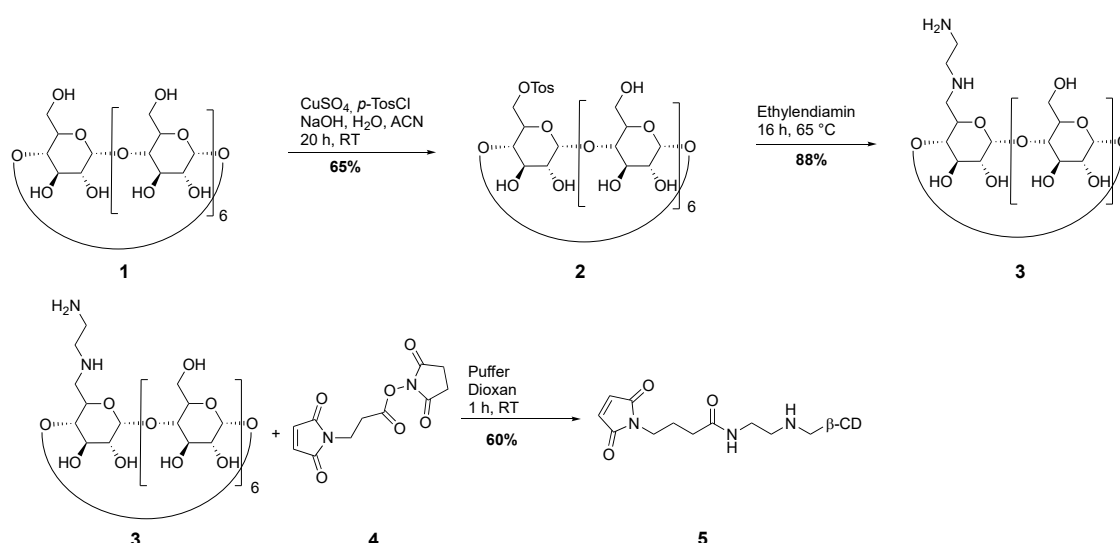


Abbildung 20: Synthese des Maleinimid-modifizierten β -Cyclodextrins.

Zur Synthese des Maleinimid modifizierten β -Cyclodextrins (Abbildung 20) wurde von β -Cyclodextrin **1** ausgehend im ersten Schritt eine primäre Hydroxygruppe einer der Glycoseseinheiten tosyliert (Verbindung **2**).¹⁶⁹ Anschließend erfolgte die Alkylierung von Ethylendiamin mit **2** zu Verbindung **3** und schließlich die Umsetzung mit dem NHS-Ester der Maleinimidpropionsäure **4** in einer nukleophilen Substitution zum Zielprodukt **5**. Das Maleinimid **4** wurde wie bereits in der Literatur¹⁷⁰ beschrieben synthetisiert. Für die Thiol-modifizierung der DNA, wurde zunächst ein Thiol-modifiziertes Phosphoramidit synthetisiert. Dabei erfolgte zunächst die Trityl-Schätzung des Thiols von 1-Thiol-6-hexanol **6**.¹⁷¹ Anschließend wurde das geschützte Thiohexanol **7** mit dem Phosphoramiditierungsreagenz **8** zu Verbindung **9** umgesetzt,¹⁷² welches in der automatisierten DNA-Festphasensynthese¹⁷³ eingesetzt werden konnte.

Die am 5'-modifizierte **STrt-DNA** wurde zunächst vom Harz abgespalten und die Trityl-Schutzgruppe mit Silbernitrat vom Thiol entfernt. Anschließend wurde Maleinimid-modifizierte Cyclodextrin **5** bei pH 6.5 mit **SH-DNA** umgesetzt (Abbildung 21). Für die Messungen wurden zwei verschiedene β -Cyclodextrin-modifizierte DNA-Sequenzen syn-

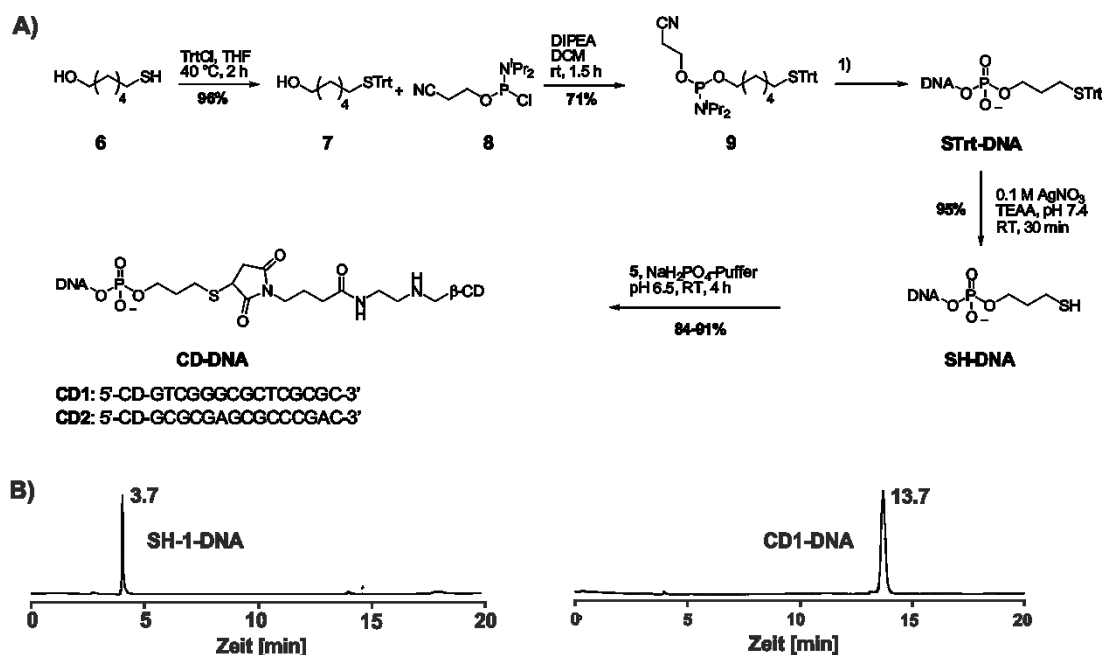


Abbildung 21: A) Synthese der β -Cyclodextrin-modifizierten DNA. B) HPLC-Chromatogramm und SH-1-DNA und CD-1-DNA.
 thetisiert (CD-1 und CD-2).

4.1.3 Synthese der Cucurbit[7]uril-modifizierten DNA

CB[7]-DNA Konjugate sind bereits in der Literatur beschrieben worden.¹⁷⁴ Zhou et al. nutzten die Azid-Alkin-Cycloaddition (CuAAC),¹⁷⁵⁻¹⁷⁶ um ein Azid-modifiziertes CB[7] mit einer Alkin-modifizierten DNA zu verbinden. Die Azid-Modifikation des CB[7] ist nicht trivial und erfolgt in mehreren Syntheseschritten.^{97, 177} Es gibt allerdings noch keine anderen Alternativen zur Azid-Modifikation des CB[7]. Da eine Alkin-Modifikation der DNA relativ einfach zu realisieren ist, stellt die CuAAC eine gute Strategie zum Erhalt der CB[7]-DNA-Konjugate dar. Diese Methode hat weiterhin den Vorteil, dass das Anbringen von Aziden oder Alkinen zu keiner großen Veränderung der biophysikalischen Eigenschaften der DNA führt. Weiterhin handelt es sich um eine chemoselektive Reaktion. Das heißt, dass Alkine und Azide meist nur untereinander und nicht mit anderen, natürlich vorkommenden funktionellen Gruppen, reagieren. Die entstehende Triazoleinheit nach der Click-Reaktion ist sehr stabil und nicht toxisch.¹⁷⁸ Aus diesen Gründen wurde sich für diese Konjugationsstrategie entschieden.

Zur Synthese der CB[7]-modifizierten DNA (Abbildung 22) wurde zunächst ein Azid-modifiziertes Cucurbit[7]uril (CB[7], **19**) nach einer in der Literatur bereits beschriebenen Syntheseroute hergestellt.^{81-82, 97} Die DNA sollte mit einem Alkin versehen werden (**Alkin-DNA**), sodass das CB[7] durch CuAAC an die DNA angebracht werden kann. Aus-

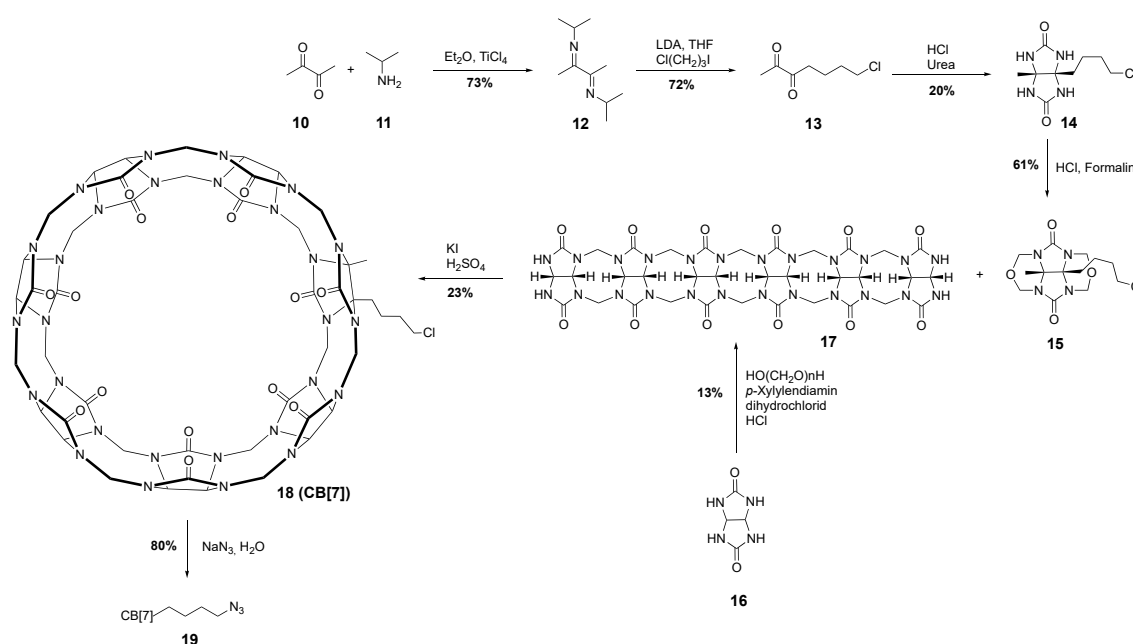


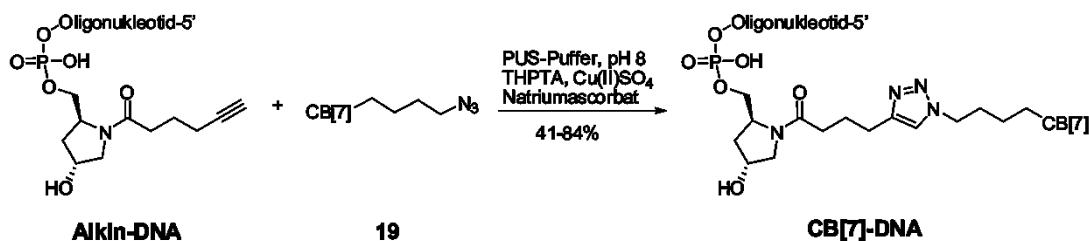
Abbildung 22: Synthese vom azidmodifiziertem Cucurbit[7]uril.

gehend von Butandion **10** wurde mit Isopropylamin **11** das Imin **12** gebildet. Danach erfolgte die Alkylierung mit 1-Chlor-3-Iodpropan zu Verbindung **13**. Dieses wurde dann mit Harnstoff zu Verbindung **14** umgesetzt. Das Harnstoffderivat **15** wurde anschließend durch die Reaktion mit Formalin in HCl erhalten. Die somit entstandene blockierte Methylenbrücke kann nach dem nächsten Reaktionsschritt als Verbrückungseinheit zwischen den Glycolurilen wirken. Dieses sollte dann mit dem hexameren Harnstoffderivat **17** zu dem chlormodifizierten CB[7] umgesetzt werden. Um das hexamere Harnstoffderivat **17** zu erhalten, wurde Glycoluril **16** templatgesteuert durch *p*-Xylylendiamin dihydrochlorid mit Paraformaldehyd in HCl zum Hexamer **17** umgesetzt. *p*-Xylylendiamin dihydrochlorid spielt bei der selektiven Ausbildung des Glycoril-Hexamers **17** eine zentrale Rolle. Zum einen führt die Ausbildung des Komplexes zwischen *p*-Xylylendiamin-dihydrochlorid und **17** zu einer thermodynamischen Stabilisierung von **17**. Zum anderen verändert es dessen Löslichkeit und das Produkt **17** fällt während der Reaktion als weißer Feststoff aus. Dies verhindert die weitere Reaktion des Hexamers zu unerwünschten Nebenprodukten, wie einer Polymerisierung mit weiteren Glycolurilen. Auch eine Cyclisierung zu Cucurbit[6]uril wird durch *p*-Xylylendiamin verhindert, da der Ring durch die Templatausbildung und dem daraus entstehenden zu großen Abstand der zu reagierenden Amine, nicht geschlossen werden kann. Ein großer Vorteil dieser Reaktion stellt die Aufreinigung dar, die ohne Säulenchromatographie auskommt. Laut Literatur besitzt das präzipitierte Produkt bereits eine Reinheit von 89%. Dieses wird zunächst in Wasser gelöst und alle sich nicht lösenden Bestandteile werden dadurch abgetrennt. Durch die Zugabe von 5 M NaOH, fällt **17** wieder aus.⁹⁷ Anschließend konnte die Cyclisierung des Hexamers **17** mit dem chlormodifizierten Harnstoffderivat **15** in Schwefelsäure mit Kaliumiodid zu Verbindung **18** durchgeführt werden. Die Aufreinigung dieser Reaktion durch eine Ionenaustauschchromatographie ist nicht optimal und sehr aufwendig. Allerdings gibt es bis jetzt keine praktikablen Alternativen um **18** zu erhalten. Die Ausbeuten der letzten zwei beschriebenen Reaktionen sind moderat. In einem letzten Schritt wurde das chlormodifizierte CB[7] **18** mit Natriumazid zu Zielprodukt **19** in guter Ausbeute (80%) umgesetzt.

Durch die Verwendung eines Alkin-modifizierten Harzes in der automatisierten DNA-Festphasensynthese¹⁷³ konnte problemlos ein Alkin an das 3'-Ende der DNA angebracht werden. Die Kupfer-Click Reaktion der so erhaltenen **Alkin-DNA** und dem Azid-

modifizierten CB[7] **19** wurde in PUS-Puffer mit Kupfer(II)-Sulfat, Tris(3-hydroxypropyltriazolylmethyl)amin (THPTA) und Natriumascorbat durchgeführt. Nach Entfernung des Kupfers aus der Reaktionslösung lieferte die HPLC-Aufreinigung das

A)



B)

CB-1: 5'-GTCGGGCGCT-CB-3'

CB-2: 5'-GGAACCGCCG-CB-3'

CB-3: 5'-TCATTCCAGATCTCCTTAGGG-CB-3'

CB-4: 5'-GTTTCAGTGACATAGGCCAGT-CB-3'

CB-5: 5'-CCATATGGACTCATTCCAGATCTCCTTACGC-CB-3'

C)

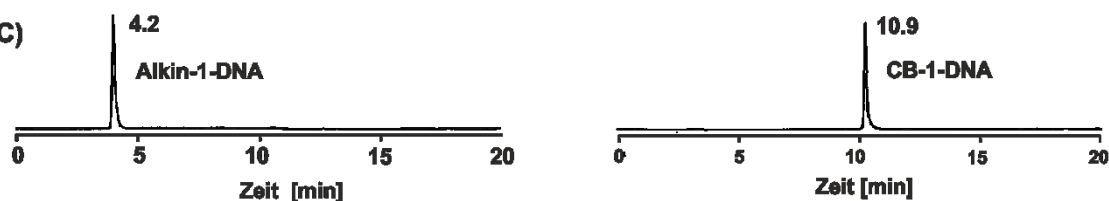


Abbildung 23: **A)** Synthese der CB-modifizierten DNA. **B)** Sequenzen der CB-modifizierten DNA. **C)** HPLC-Chromatogramme der **Alkin-1-DNA** und der **CB-1-DNA**.

Cucurbit[7]uril-modifizierte Oligonukleotid (**CB[7]-DNA**, **CB-1** - **CB-5**) (Abbildung 23).

4.1.4 Synthese der Adamantan-modifizierten DNA

Die Synthese der Adamantan-modifizierten DNA erfolgte nach einer in der Literatur beschriebenen Methode (Abbildung 24).¹⁷⁹ Die DNA wurde mit Hilfe der DNA-Festphasensynthese¹⁷³ synthetisiert und am 5'-Ende mit einem C-10-Carboxymodifizier versehen (**C-10-DNA**). Dieser hält die Carboxylgruppe als *N*-Hydroxysuccinimidester für die nachfolgende Kupplung des Amantadins (**2**) an der festen Phase mit DIPEA in trockenem DMSO an DNA bereit (**Ad2-DNA**). Für die Kupplung des Adamantanethylendiamins (**1**) an DNA (**Ad1-DNA**) wurde das gleiche Protokoll verwendet. Die modifizierten DNA-Stränge konnten nach der Synthese in Ausbeuten zwischen 10% und 25% erhalten werden. Dabei beziehen sich die Ausbeuten auf die DNA-Synthese und die Adamantan-Kupplung zusammen und sind deshalb Abhängig von der Länge der DNA. Für kürzere

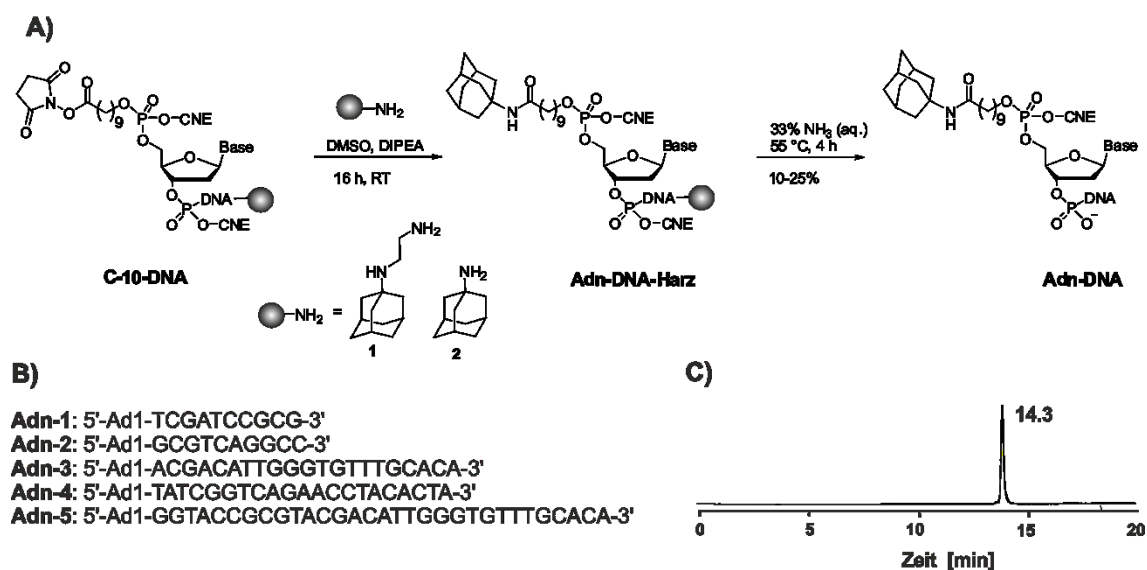


Abbildung 24: A) Synthese Adamantyl-modifizierter DNA. B) Sequenzen Adamantyl-modifizierter DNA. C) Analytisches HPLC-Chromatogramm von **Adn-1**.
 DNA-Sequenzen wurden bessere Ausbeuten erhalten, als für längere.

4.1.5 Bindungsstudien der β -Cyclodextrin/Rhodamin B-Interaktion

Bei Bindung von Rhodamin B an β -Cyclodextrin erniedrigt sich die Intensität der Fluoreszenzemission. Dies ermöglicht die Bestimmung von Bindungskonstanten. Die Affinität von freiem Rhodamin B für β -Cyclodextrin liegt im mikromolaren Bereich ($K_D = 196 \mu\text{M}$).⁷⁴ Um Bindungsstudien durchzuführen, müsste die Intensität der Rhodamin B-Fluoreszenz bei verschiedenen Konzentrationen von β -Cyclodextrin gemessen werden. Mono- und bivalente Komplexe können konstruiert werden, indem sowohl β -Cyclodextrin als auch Rhodamin B kovalent an DNA gebunden werden. Die Synthese von **CD-DNA** ist in Abschnitt 4.1.2 beschrieben und die Rhodamin B-modifizierten Oli-

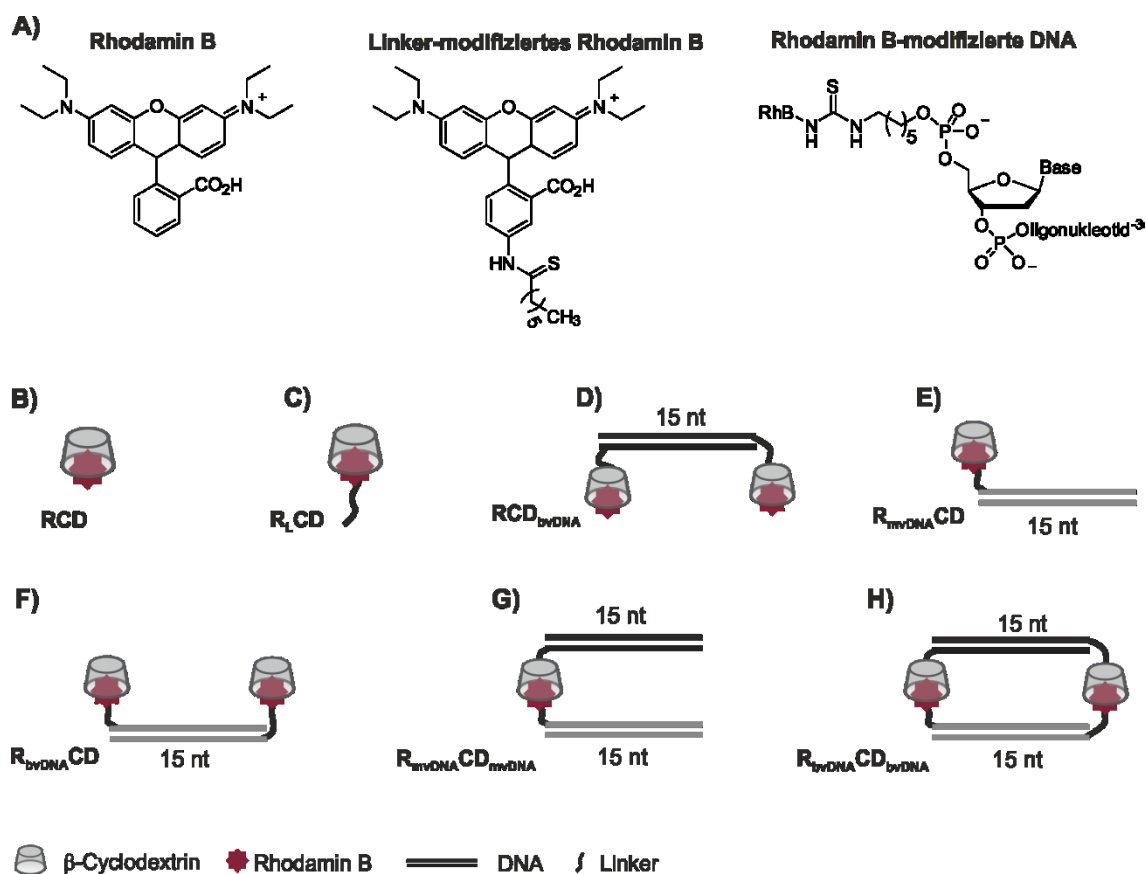


Abbildung 25: **A)** Chemische Strukturen von Rhodamin B, Linker-modifiziertem Rhodamin B und Rhodamin B-modifizierter DNA. **B)-H)** Verschiedene Rhodamin B/ β -Cyclodextrin-Komplexe. L = Linker; mv = monovalent, bv = bivalent, R = Rhodamin B, CD = β -Cyclodextrin: **B)** RCD: Rhodamin B und β -Cyclodextrin. **C)** R_LCD: Rhodamin B und Linker-modifiziertes- β -Cyclodextrin. **D)** RCD_{bvDNA}: Rhodamin B und bivalenter β -Cyclodextrin-DNA Komplex. **E)** R_{mvDNA}CD: monovalenter Rhodamin B-DNA-Komplex und β -Cyclodextrin. **F)** R_{bvDNA}CD: bivalenter Rhodamin B-DNA-Komplex und β -Cyclodextrin. **G)** R_{mvDNA}CD_{mvDNA}: monovalenter Rhodamin B-DNA-Komplex und monovalenter β -Cyclodextrin-DNA-Komplex. **H)** R_{bvDNA}CD_{bvDNA}: bivalenter Rhodamin B-DNA-Komplex und bivalenter β -Cyclodextrin-DNA-Komplex.

gonukleotide konnten kommerziell erhalten werden.

Die Anbringung von Rhodamin B und β -Cyclodextrin an DNA geschieht zwangsweise über einen Linker, der Gast und Wirt mit dem DNA-Gerüst verbindet (Abbildung 25 A). Diese Linker können einen Einfluss auf die Bindungskonstante ausüben. Der Einfluss des β -Cyclodextrin-Linkers auf die Bindungskonstante wurde bereits von Hoa le Chen im Rahmen einer Bachelorarbeit untersucht. Dabei konnte kein signifikanter Einfluss des β -Cyclodextrin-Linkers auf die Stärke des Gast-Wirt-Komplexes beobachtet werden. Der Einfluss des Rhodamin B-Linkers auf die Bindungsaffinität wurde allerdings noch nicht untersucht und sollte im Rahmen dieser Arbeit bestimmt werden. Dafür wurden die Bindungsaffinitäten von nicht modifiziertem Rhodamin B und β -Cyclodextrin (**RCD**, Abbildung 25 B) mit der Bindungsaffinität von Linker-modifizierten Rhodamin B und β -Cyclodextrin (**R_LCD**, Abbildung 25 C) verglichen. Außerdem sollten noch verschiedene monovalente Systeme, bei denen nur das β -Cyclodextrin (**RCD_{bvDNA}**, Abbildung 25 D) oder nur das Rhodamin B (**R_{mvDNA}CD**, **R_{bvDNA}CD**, Abbildung 25 E, F) an die DNA angebracht sind, untersucht werden. Schließlich sollte die bivalente Verstärkung bei dem Vergleich des monovalenten Komplexes **R_{mvDNA}CD_{mvDNA}** mit dem bivalenten Komplex **R_{mvDNA}CD_{bvDNA}** (Abbildung 25 G, H) ermittelt werden.

Zunächst wurde die Dissoziationskonstante von Rhodamin B und β -Cyclodextrin (**RCD**) bestimmt. Dabei wurde Rhodamin B in einer Konzentration von 500 nM vorgelegt, β -Cyclodextrin 1 bis zu einer Konzentration von 2 mM hinzutitriert, die Emmissionsspektren mit dem Fluoreszenzspektroskop gemessen und daraus die Emmissionsmaxima bestimmt. Die Fluoreszenzintensität sinkt, wie erwartet, bei Zugabe von β -Cyclodextrin und erreicht einen konstanten Wert ab einer bestimmten β -Cyclodextrin-Konzentration. Der daraus bestimmte K_D -Wert für den Komplex **RCD** betrug 44 μ M (Abbildung 27).

In den in dieser Arbeit synthetisierten Konjugaten ist Rhodamin B mittels einer Isothio-

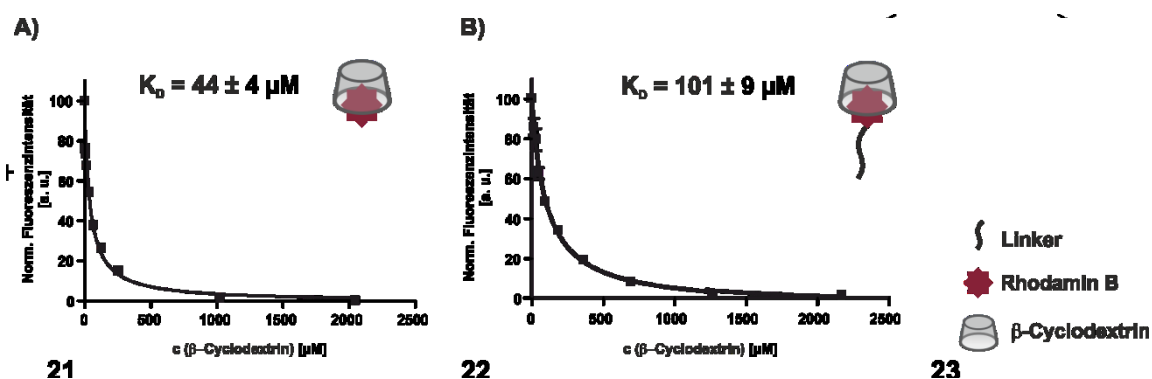


Abbildung 27: Rhodamin B-Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit der β -Cyclodextrin-Konzentration: **A)** Rhodamin B wurde in einer Konzentration von 500 nM vorgelegt und β -Cyclodextrin bis zu einer Konzentration von 2.1 mM hinzutitriert. **B)** Rhodamin B wurde in einer Konzentration von 500 nM vorgelegt und Linker-modifiziertes β -Cyclodextrin bis zu einer Konzentration von 2.3 mM hinzutitriert. Bedingungen: HEPES-Puffer: 10 mM HEPES, 1 mM $MgCl_2$, pH 7.5). Das Maximum wurde aus drei unabhängigen Messungen bestimmt.

cyanatkupplung kovalent an eine Amin-modifizierte DNA gebunden. Ein Einfluss des so entstandenen Linkers zwischen der DNA und dem Farbstoff auf die Bindungsaffinität zum β -Cyclodextrin konnte nicht ausgeschlossen werden. Dies sollte mit dem Komplex **R_LCD** untersucht werden. Hierzu wurde Rhodamin B-Isothiocyanat mit Aminohexanol modifiziert und die Dissoziationskonstante bestimmt. Zur Synthese des Linker-modifizierten Rhodamin B's **23**, wurde Rhodamin B-Isothiocyanat **22** mit Aminohexanol **21** 4 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und anschließend säulenchromatographisch aufgereinigt (Abbildung 26). Die Aufreinigung des Produkts erwies sich als schwierig, da sich das Rhodamin B **23** auf dem Kieselgel zersetzte. Nichtsdestotrotz konnte eine Fraktion mit einer Reinheit von 95% isoliert werden. Die Reinheit des Produkts wurde mittels analytischer HPLC bestimmt, da für eine NMR-spektroskopische Untersuchung nicht genug Substanz zur Verfügung stand. Für die Messung der Bindungskonstante wurde nicht viel Substanz benötigt, sodass die Reaktion nicht noch einmal wiederholt, bzw. optimiert wurde. Die Bestimmung erfolgte analog zum unmodifizierten Rhodamin B. Die Bindungskonstante für das Linker-modifizierte Rhodamin B und β -Cyclodextrin (**R_LCD**) betrug 101 μ M (Abbildung 27). Folglich hatte die Anbringung des Linkers an Rhodamin B einen leicht negativen Einfluss auf die Dissoziationskonstante. Dieser negative Einfluss kann durch die sterisch anspruchsvollere Struktur des Rhodamin B-Farbstoffs erklärt werden. Die leicht verschlechterte Bindungsaffinität konnte allerdings für die nachfolgenden Messungen vernachlässigt werden, da dadurch keine signifikant höhere Menge an Konjugaten für die Bestimmung der Bindungsaffinitäten benötigt werden.

Da bei Anbringung der Gastmoleküle und der Wirte an DNA der sterische Anspruch steigt und auch die Ladung der DNA einen Einfluss auf das Gast-Wirt-System ausüben könnte, sollten die Bindungsaffinitäten für die folgenden Komplexe bestimmt werden:

- I. β -Cyclodextrin-DNA-Konjugat mit freiem Rhodamin B (**RCD_{bvDNA}**).
- II. Rhodamin B-DNA-Konjugate mit freiem β -Cyclodextrin (**R_{mvDNA}CD**, **R_{bvDNA}CD**).

Vor den Messungen wurden Schmelzkurven der hier verwendeten modifizierten DNA-Doppelstränge aufgenommen und dabei wurden Schmelztemperaturen von über 60 °C erhalten. Dies gewährleistet die Ausbildung der DNA-Doppelstrangstruktur bei Raumtemperatur. Für die Bindungsmessungen in Anwesenheit von DNA wurde zunächst nicht modifiziertes Rhodamin B vorgelegt und bivalent modifizierte β -Cyclodextrin-DNA hin-

zu titriert (\mathbf{RCD}_{bvDNA}). Der erhaltene K_D -Wert von 88 μM zeigt, dass die Anbringung an DNA zwar einen leicht negativen Einfluss auf den Gast-Wirt-Komplex ausübt, der jedoch in Kauf genommen werden könnte (Abbildung 28). Anschließend wurde ein bivalenter Rhodamin B-DNA-Komplex vorgelegt und β -Cyclodextrin hinzu titriert ($\mathbf{R}_{bvDNA}\mathbf{CD}$). Hierbei zeigte sich eine deutlich schwächere Bindung mit einem K_D -Wert von 1.14 mM. Auch die Dissoziationskonstante zwischen einem monovalenten Rhodamin B-DNA-Komplex und β -Cyclodextrin ($\mathbf{R}_{mvDNA}\mathbf{CD}$) ergab einen ähnlich hohen Wert (1.44 mM) (Abbildung 28). Aufgrund der hohen K_D -Werte war es nicht möglich weitere Messungen durchzuführen. Zum einen werden sehr hohe Mengen an modifizierter DNA benötigt, was den Synthesaufwand deutlich erhöht. Zum anderen wurde beobachtet, dass ab einer bestimmten DNA-Konzentration, das Emmissionsmaximum des Rhodamin B's wieder anstieg und eine Bestimmung der Bindungskonstante somit nicht möglich war. Ein möglicher Grund für die geringe Bindungsaffinität der Komplexe $\mathbf{R}_{mvDNA}\mathbf{CD}$ und $\mathbf{R}_{bvDNA}\mathbf{CD}$ könnte eine Interaktion zwischen Farbstoff und Träger-DNA sein. Rhodamin B trägt eine positive Ladung und könnte sowohl mit den negativ geladenen Phosphatgruppen der DNA als auch durch π -Stacking mit den Nukleobasen interagieren. Eine Erhöhung der Magnesiumkonzentration würde die negative Ladung der DNA abschirmen und könnte zumindest diese Interaktion verhindern oder minimieren. Folglich wurden die Messungen mit der Rhodamin B-modifizierten DNA und β -Cyclodextrin ($\mathbf{R}_{mvDNA}\mathbf{CD}$ und $\mathbf{R}_{bvDNA}\mathbf{CD}$) bei verschiedenen Magnesiumkonzentrationen durchgeführt. Eine zu hohe Konzentration MgCl_2 sollte jedoch nicht verwendet werden. Ab einer Konzentration von 700 mM MgCl_2 kann Z-DNA¹⁸⁰ ausgebildet werden. Weiterhin könnten bei hohen Magnesiumkonzentrationen auch weitere Doppelstrang-Doppelstrang-Wechselwirkungen auftreten, die die Bindungsaffinität des Gast-Wirt-Komplexes beeinflussen könnten.

Abbildung 29: Fluoreszenzintensität eines monovalent modifizierten Rhodamin B-Komplexes in Abhängigkeit von der Konzentration eines monovalent modifizierten β -Cyclodextrin-DNA-Komplexes bei einer Magnesiumchloridkonzentration von 10 mM in HEPES-Puffer (10 mM HEPES, pH 7.5).

sind ($\mathbf{R}_{mvDNA}CD_{mvDNA}$ und $\mathbf{R}_{bvDNA}CD_{bvDNA}$), wurden in der Folge bei 10 nM und bei 100 mM $MgCl_2$ durchgeführt. Für die Wechselwirkung eines bivalenten Rhodaminkonjugats mit einem bivalenten Cyclodextrinkonjugat ($\mathbf{R}_{bvDNA}CD_{bvDNA}$) wurde bei 10 mM $MgCl_2$ ein $K_D = 12 \mu M$ und somit eine etwa 9-fach höhere Affinität ermittelt als bei Wechselwirkung zweier monovalenter Konjugate ($\mathbf{R}_{bvDNA}CD$). Bei einer Konzentration von 100 mM Magnesiumchlorid, ergab sich ein K_D -Wert von $4.5 \mu M$. Dieser Wert entspricht etwa der Hälfte des Werts bei 10 mM $MgCl_2$, was auf eine ungewollte Wechselwirkung zwischen den DNA-Gerüsten hindeuten könnte. Bei der Titration des monovalenten Rhodaminkonjugates durch das monovalente Cyclodextrinkonjugat ($\mathbf{R}_{mvDNA}CD_{mvDNA}$), sank die Rhodaminemission mit steigender Konzentration der Cyclodextrinkomponente wie erwartet ab, bis bei einer Konzentration von $500 \mu M$ ein Anstieg verzeichnet werden musste (Abbildung 29). Eine Bestimmung der Dissoziationskonstanten schien somit nicht möglich. Die Messung wurde bei einer Magnesiumkonzentration von 100 mM durchgeführt und ein K_D -Wert von $11 \mu M$ bestimmt. Die Bindungskonstante bei bivalenter Interaktion war also lediglich doppelt so hoch wie bei monovalenter Interaktion. Es wurde gefolgert, dass die monovalente Interaktion zu schwach ist, um eine bivalenzverstärkte Bindung zu erzielen.

Durch Verwendung affinerer Gast-Wirt-Wechselwirkungen, könnte diesem Problem begegnet werden. Wie bereits erwähnt, bilden Cucurbiturile mit vielen Molekülen und Farbstoffen stabile Wirt-Gast-Komplexe aus. Deshalb wurde für die nächsten Messungen das Cucurbit[7]uril als Wirt gewählt.

4.1.6 Verdrängung von Rhodamin B mit Adamantyl-DNA

CB[7] bildet Gast-Wirt-Komplexe mit Adamantyl-basierten Gästen aus. Ein System basierend auf diesen Gast-Wirt-Komplex stellt ein geeignetes Modell zur Bestimmung der Reichweite der Bivalenz dar. Je nach Modifikation am Adamantan können hierbei sehr starke Bindungskonstanten bis in den attomolaren Bereich erhalten werden.⁹⁴ Modifizierte Adamantanamine sind kommerziell erhältlich und können unkompliziert an DNA angebracht werden, was Variationen der monovalenten Bindungsaffinitäten erleichtert. Zur Charakterisierung der Bindung wurde ein fluoreszenzbasierter Assay mit Rhodamin B erprobt. Rhodamin B bindet mit einer Bindungskonstante im μM -Bereich an das CB[7]. Im Gegensatz zu β -Cyclodextrin, erhöht sich die Fluoreszenzintensität von Rhodamin B bei Bindung an CB[7]. Adamantan sollte in der Lage sein, Rhodamin B aus dem Käfig zu verdrängen, da es eine deutlich stärkere Bindung zu CB[7] aufbaut.⁹⁰ Es sollte daher möglich sein, die Interaktion bivalenter Adamantankonjugate mit bivalenten CB[7]-Konjugaten über Messungen der IC₅₀-Werte zu charakterisieren. Hierzu sollte die CB[7]-modifizierte DNA mit Rhodamin B in einer bestimmten Konzentration vorgelegt werden, um anschließend mit Adamantan-modifizierter DNA das Rhodamin B wieder aus dem CB[7]-Käfig zu verdrängen. Als Vorexperiment wurde zunächst die Bindungsaffinität zwischen azid-modifiziertem CB[7] und Rhodamin B bestimmt. Die Bindungsaffinität zwischen Rhodamin B und CB[7] wurde bereits in der Literatur beschrieben ($6.25 \mu\text{M}$).⁸⁰ Um einen negativen Linker- oder Puffereinfluss der Bindung von CB[7] zum Rhodamin B auszuschließen, wurden die Emissionsspektren von Rhodamin B in Wasser, HE-

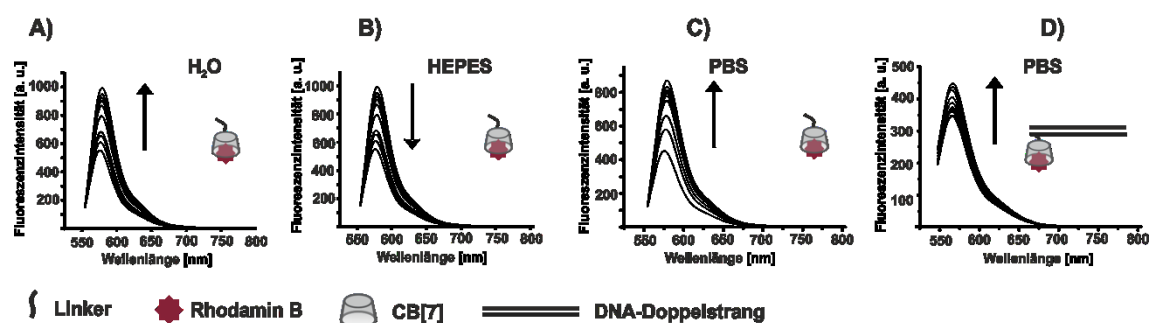


Abbildung 30: Emissionsspektren von Rhodamin B ($c = 2.5 \mu\text{M}$) bei verschiedenen Konzentrationen von CB[7] oder CB[7]-DNA-Komplexen ($c_{\text{max}} = 800 \mu\text{M}$). **A)** CB[7], H_2O . **B)** CB[7]: HEPES-Puffer: 15 mM HEPES, 1 mM MgCl_2 , pH 7.5. **C)** CB[7] in Phosphatpuffer: 10 mM NaH_2PO_4 , 1 mM MgCl_2 , pH 7.5. **D)** Monovalenter CB[7]-DNA-Komplex in Phosphatpuffer: 10 mM NaH_2PO_4 , 1 mM MgCl_2 , pH 7.5. Nach oben gerichteter Pfeil: Erhöhung der Fluoreszenzintensität mit ansteigender CB[7]-Konzentration. Nach unten gerichteter Pfeil: Verringerung der Fluoreszenzintensität mit ansteigender CB[7]-Konzentration. Die DNA-Sequenzen sind in Tabelle 7 beschrieben.

PES-Puffer und Phosphatpuffer bei verschiedenen Konzentrationen von azid-modifiziertem CB[7] **19** aufgenommen und die Intensitäten der Emission erfasst. Zunächst wurde die Dissoziationskonstante in Wasser gemessen. Hierbei sank das Emissionsmaximum des Rhodamin B's, wie erwartet, mit zunehmender Konzentration von CB[7] und es wurde ein K_D -Wert von 5.1 μM (Lit. 6.25 μM) erhalten. Somit hat der Linker keinen großen Einfluss auf die Bindung (Abbildung 30 A). Als nächstes wurde das gleiche Experiment in HEPES-Puffer durchgeführt. Überraschenderweise stieg die Intensität der Emission von Rhodamin B mit zunehmender Konzentration an CB[7] nicht an sondern sank (Abbildung 30 B). HEPES ist ein organisches Amin, welches theoretisch auch in den Hohlraum des CB[7] eindringen könnte. Somit könnte es die Interaktion zwischen Rhodamin B und CB[7] stören und ein verändertes Fluoreszenzverhalten von Rhodamin B verursachen. Für die folgenden Experimente wurde ein Phosphatpuffer ausgewählt (Abbildung 30 C). Bei der Messung der Bindungskonstanten von Rhodamin B und Azid-modifiziertem CB[7] (**RCB_L**) in Phosphatpuffer wurde ein K_D -Wert von 30.8 μM ermittelt. Das Puffersystem führt folglich zu einer leichten Schwächung der Bindungsaffinität. Als Nächstes wurde der Einfluss der DNA auf das Gast-Wirt-System im Phosphatpuffer untersucht. Hierzu wurde ein monovalent modifizierter CB[7]-DNA-Doppelstrang (**RCB_{mvDNA}**, Abbildung 30 D) verwendet. Es wurde ein K_D -Wert von 84.6 μM erhalten. Ähnlich wie auch bei dem Gast-Wirt-System mit β -Cyclodextrin führt

die Anbindung des Wirtes an die DNA zu einer Erhöhung der Dissoziationskonstanten und somit zu einer Schwächung der Bindung. Die Bindungsaffinitäten befinden sich hierbei zwar im gleichen Bereich wie bei dem Modellsystem mit β -Cyclodextrin und Rhodamin B, allerdings können hier die Bindungsexperimente höchstwahrscheinlich bei geringeren Konzentrationen durchgeführt werden, da Adamantanamine an CB[7] deutlich stärker binden als an β -Cyclodextrin. Ob das Adamantan in der Lage ist, Rhodamin B aus dem Käfig des CB[7] zu verdrängen, sollte in orientierenden Untersuchungen eruiert werden (Abbildung 31). Hierfür wurde Azid-modifiziertes CB[7] in einer Konzentration von 15 μM und Rhodamin B in einer Konzentration von 2.5 μM vorgelegt und Amantadin in verschiedenen Konzentrationen hinzutitriert. Wie erwartet, sank die Fluoreszenz des Rhodamin B's bei steigender Konzentration von Amantadin (Abbildung 31) und die Messung ergab einen IC50-Wert von 1.99 μM . Dieser Wert verspricht Messungen bei deutlich niedrigerer Konzentration durchführen zu können, als bei dem in Kapitel 4.1.5 beschriebenen β -Cyclodextrin/Rhodamin B-System.

Es wurden jeweils zwei unterschiedliche 10 nt-lange Sequenzen mit CB[7] (CB-1 und CB-2), Amantadin (Ad2-1 und Ad2-2) oder Adamantanethyldiamin (Ad1-1 und Ad1-2) modifiziert. Durch die Hybridisierung mit unterschiedlichen Templaten, konnten verschiedene monovalente und bivalente Systeme erhalten werden (Abbildung 32). Den Ein-

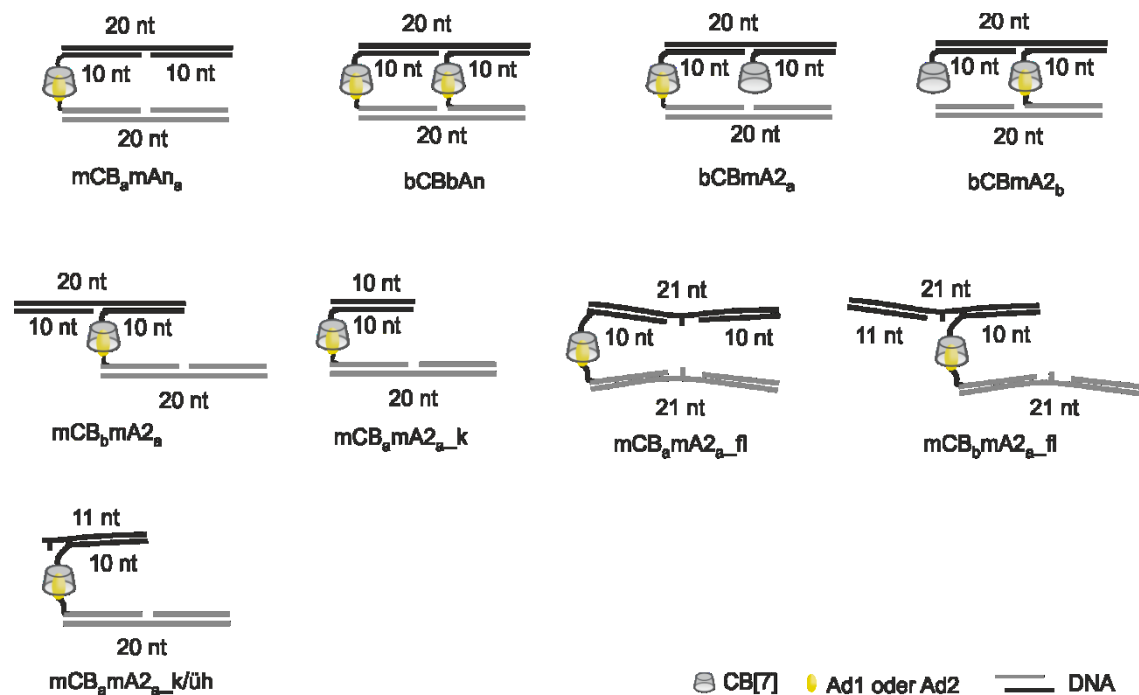


Abbildung 32: Modellkomplexe für die Bestimmung der IC50 Werte für Verdrängung von Rhodamin B aus dem CB[7]-Käfig. m = monovalent, b = bivalent, CB = Cucurbit[7]uril, An = Adamantanethyldiamin-modifiziert (Ad1) oder Amantadin-modifiziert (Ad2), k = kurz, fl = flexibel, üh = Überhang. Die DNA-Sequenzen sind in Tabelle 7 beschrieben.

fluss, den DNA auf die Bindungsstärke ausübt, wurde durch Vergleich von Konjugaten geführt, bei denen der Wirt entweder außen (**mCB_amAn_a**) am Doppelstrang oder in der Mitte (**mCB_bmA2_a**) angebracht wurde. Da die hier verwendeten Sequenzen relativ kurz sind und die Wirte dementsprechend nah beieinander liegen, könnte auch Rückbindung einen Einfluss auf die erhaltenen IC₅₀-Werte haben. Deswegen sollten auch monovalente Komplexe untersucht werden, bei denen zwei Wirte, aber nur ein Gast vorhanden war (**bCBmA2_a** und **bCBmA2_b**). Auch durch den Vergleich unterschiedlich langer DNA-Stränge (vgl. **mCB_amA2_a** mit **mCB_amA2_{a_k}**) kann der Einfluss der DNA untersucht werden. Die Flexibilität des DNA-Gerüsts kann durch ungepaarte Nukleotide erhöht werden (**mCB_amA2_{a_fl}** und **mCB_bmA2_{a_fl}**) und sollte auch hier Gegenstand der Untersuchungen sein.

Vor den Bindungsmessungen wurden Denaturierungsexperimente durchgeführt, um die DNA-Duplexausbildung bei Raumtemperatur zu gewährleisten. Alle erhaltenen Schmelztemperaturen lagen bei 1 μ M DNA-Konzentration über 40 °C. Dies bedeutet, dass bei Raumtemperatur in diesem Konzentrationsbereich eine DNA-Doppelstrangstruktur vorliegt. Zunächst wurden Messungen bei 1 mM MgCl₂ durchgeführt. Um den IC₅₀-Wert für den monovalenten Fall zu bestimmen, wurde monovalent modifizierte CB[7]-DNA

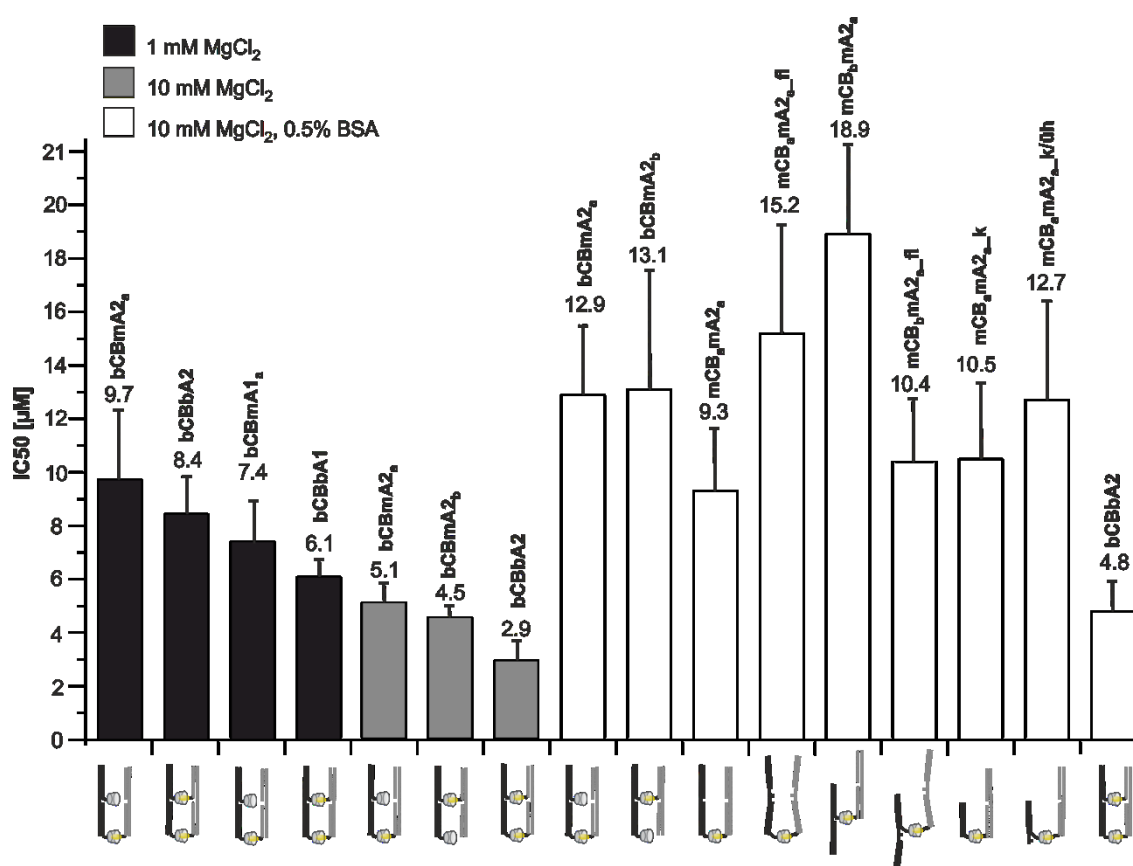


Abbildung 33: IC₅₀-Werte der gemessenen Komplexe für ein Verdrängungsexperiment mit Rhodamin B. Schwarze Balken: 1 mM MgCl₂, graue Balken: 10 mM MgCl₂, weiße Balken: 10 mM MgCl₂, 0.5% BSA. Bedingungen: 2.5 μ M Rhodamin B, 40 μ M CB[7]-DNA, 0-300 μ M Adn-DNA, 10 mM NaH₂PO₄, pH 7.5. m = monovalent, b = bivalent, CB = Cucurbit[7]uril, An = Adamantanethyldiamin-modifiziert (Ad1) oder Amantadin-modifiziert (Ad2), k = kurz, fl = flexibel, üh = Überhang.

mit Rhodamin B vorgelegt und mit Adamantan-modifizierter-DNA (**Ad1-DNA** oder **Ad2-DNA**) das Rhodamin B aus dem CB[7]-Käfig verdrängt. Für beide Systeme konnten IC50-Werte sowohl für den monovalenten (**bCBmA1_a** und **bCBmA2_a**) als auch für den bivalenten Fall (**bCBbA1** und **bCBbA2**) bestimmt werden, wobei die IC50-Werte für Binder **1** etwas niedriger waren als für Binder **2** (Abbildung 33). Dies entspricht auch Literaturmessungen.⁷¹ Auch wenn die bivalenten Komplexe thermodynamisch stabiler erschienen als die monovalenten Komplexe, so ist das Ausmaß der Stabilisierung (um das 1.2-fache) zu gering, um von einer Bivalenzverstärkung sprechen zu können.

Bei einer bivalenten Bindung könnte die gegenseitige Abstoßung der DNA-Doppelstränge einen negativen Effekt auf die Bindungsaffinität haben. Deshalb wurde die Magnesiumchloridkonzentration auf 10 mM erhöht, um die negative Ladung und somit auch die DNA_{ds}-DNA_{ds}-Abstoßung abzuschwächen. Die folgenden Messungen erfolgten nur noch mit Binder Ad2. Der monovalente IC50 Wert für den Komplex **bCBmA2_a** sinkt von 7.4 µM (1 mM MgCl₂) auf 5.1 µM (10 mM MgCl₂), der bivalente Wert (**bCBbA2**) sinkt von 6.1 (1 mM MgCl₂) auf 2.9 µM (10 mM MgCl₂). Zwar vergrößert sich der Unterschied zwischen dem monovalenten und dem bivalenten Komplex bei höherer Magnesiumkonzentration, allerdings ist der Effekt immer noch gering. Ein solcher Effekt kann jedoch nur beobachtet werden, wenn beide Liganden, unabhängig davon wo sie angebracht sind, eine ähnliche Affinität zum Rezeptor aufweisen. Es wurde jedoch ein IC50-Wert von 4.5 µM für den monovalenten Komplex **bCBmA2_b** erhalten (Abbildung 33). Somit kann eine ungleiche Bindungsaffinität der Liganden nicht die Ursache für das Fehlen des bivalenten Effekts sein. Um mögliche ungewollte Interaktionen mit der Wellplatte auszuschließen, wurden zusätzlich Messungen mit 0.5% BSA durchgeführt (Abbildung 33). Es sollte auch untersucht werden, ob eine unterschiedliche Anbringung von CB[7] am DNA-Doppelstrang, d.h. außen (**mCB_amA2_a**) oder innen am Doppelstrang (**mCB_bmA2_a**) zu unterschiedlichen IC50-Werten führt. Da bei diesen Systemen sowohl Gast- als auch Wirt-DNA nur monovalent modifiziert war, sollte hier auch eine eventuelle Rückbindung ausgeschlossen werden. Schlussendlich wurde auch der Einfluss der Flexibilität des DNA-Doppelstranges mit den Komplexen **mCB_amA2_a_fl** und **mCB_bmA2_a_fl**, der Einfluss der DNA-Länge mit dem Komplex **mCB_amA2_a_k** und auch der Einfluss eines freien ungepaarten Nukleotids in unmittelbarer Nähe des monovalenten Gast-Wirt-Komplexes (**mCB_amA2_a_k/üh**) auf den IC50-Wert untersucht. Zunächst fällt auf, dass

die erhaltenen IC₅₀-Werte höher ausfielen, als bei Messungen ohne BSA. Dies deutet darauf hin, dass in Gegenwart von BSA eine höhere Menge des kompetitierenden Stoffs benötigt wird, um das Rhodamin B aus dem Käfig zu verdrängen. Weiterhin schwanken alle Werte für die monovalenten Interaktionen relativ stark, denn für den stärksten monovalenten Binder (**mCB_amA2_a**) wurde ein IC₅₀-Wert von 9.3 µM und für den schwächsten Komplex (**mCB_bmA2_a**) ein doppelt so hoher Wert von 18.9 µM ermittelt. Für den bivalenten Komplex (**bCBbA2**) wurde ein IC₅₀-Wert von 4.8 µM erhalten. Wieder bleibt also die Bindungsverstärkung, die durch bivalente Anordnung erzielt wurde, gering. Eine Ursache für den scheinbar fehlenden Bivalenzeffekt könnte in der außerordentlich starken Bindung zwischen Adamantan und CB[7] liegen. In der Literatur werden hier sogar Bindungskonstanten vom piko- bis attomolaren Bereich beschrieben. Zwar wurde die Stärke der Bindung zwischen Adamantan und CB[7], welche beide kovalent an DNA angebracht sind, hier nicht bestimmt, aber es lässt sich vermuten, dass diese ebenfalls relativ stark ist. Die Bindungskonstante zwischen Rhodamin B und CB[7] liegt im mikromolaren Bereich und ist somit relativ schwach im Vergleich zur Adamantan/CB[7]-Bindung. Bei einer zu geringen Affinität des vorgelegten Gastes für den Wirt, wird der Gast schon mit einem monovalenten Liganden bei relativ geringen Konzentrationen aus dem Käfig verdrängt werden können. Der Unterschied zwischen einem monovalenten und einem bivalenten System würde damit sehr gering oder wäre gar nicht beobachtbar. Um dieses Problem zu umgehen, kann ein Fluoreszenzfarbstoff verwendet werden, der deutlich besser an CB[7] bindet als das Rhodamin B.

4.1.7 Verdrängung von Pyronin B mit Adamantyl-DNA

Pyronin B (Abbildung 34) bindet laut Literatur mit einem K_D -Wert von 100 nM an CB[7].^{78, 80} Dies entspricht einer deutlich stärkeren Bindung (ca. 50fach) als zwischen Rhodamin B und CB[7]. Da die Anbringung von CB[7] an DNA auch schon bei vorheri-

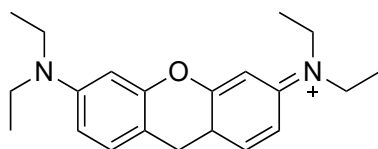


Abbildung 34: Strukturformel von Pyronin B.

gen Experimenten zu einer Verschlechterung der Bindung geführt hat, wurde auch hier zunächst die Dissoziationskonstante zwischen Pyronin B und CB[7]-modifizierter DNA bestimmt. Analog zu Rhodamin B erhöht sich die Fluoreszenzintensität von Pyronin B bei der Bindung an CB[7]. Pyronin B wurde in einer Konzentration von 100 nM vorgelegt und ein monovalent modifizierter CB[7]-DNA_{ds}-Komplex hinzutitriert, bis eine Sättigung der Zunahme des Emissionsintensität zu verzeichnen war. Diese Zunahme erreichte einen halbmaximalen Wert bei 2.3 μ M (Abbildung 35). Dies entspricht einem deutlich schwächeren K_D -Wert zwischen Pyronin B und DNA-freiem CB[7] (100 nM). Dennoch ist diese Wechselwirkung etwa 40 mal stärker, als die Interaktion zwischen Rhodamin B und CB[7]-modifizierter DNA (84.6 μ M).

Die hier angegebene Bindungskonstante wurde an einem Küvetten-basierten Fluoreszenzspektrometer (Abbildung 35 B) bestimmt. Allerdings würden Messungen an einem Plattenlesegerät deutliche Zeitersparnisse bringen. Weiterhin wäre es dadurch möglich, die Messungen mit deutlich geringeren Volumina durchzuführen, wodurch die Probenmenge und dadurch auch der Synthesaufwand reduziert werden könnte. Dafür sollte zu-

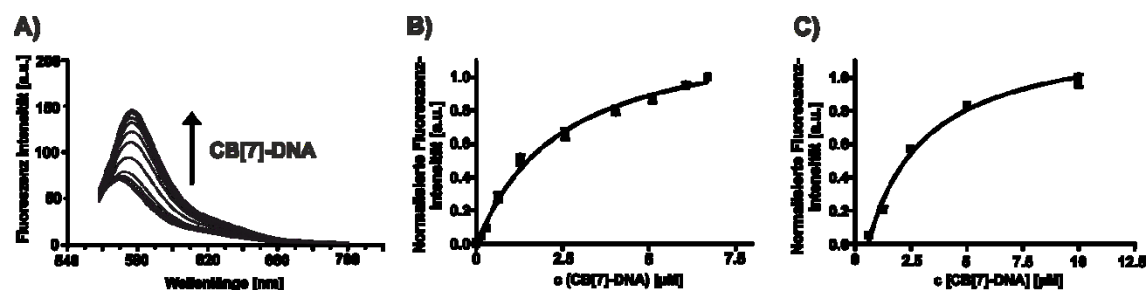


Abbildung 35: A) Emissionsspektren von Pyronin B in Abhängigkeit der CB[7]-DNA-Konzentrationen. B) Fluoreszenzintensität von Pyronin B in Abhängigkeit der CB[7]-DNA Konzentration, gemessen mit dem Fluoreszenzspektrometer. C) Fluoreszenzintensität von Pyronin B in Abhängigkeit der CB[7]-DNA Konzentration, gemessen mit dem Plattenlesegerät. Bedingungen: Phosphatpuffer: 10 mM NaH_2PO_4 , 10 mM MgCl_2 , 0.5% BSA, pH 7.5, 100 nM Pyronin B.

nächst geprüft werden, ob die Bindungskonstante von CB[7]-modifizierter DNA und Pyronin B auch am Plattenlesegerät reproduziert werden kann. Hierfür wurden die Messungen bei den gleichen Bedingungen wie auch beim Fluoreszenzspektrometer durchgeführt (Abbildung 35 C). Der erhaltene Wert von $2.0 \mu\text{M}$ weicht nicht signifikant von der Messung am Küvetten-basierten Fluoreszenzspektrometer ab. Deshalb wurden die nächsten Messungen am Plattenlesegerät durchgeführt.

Um zu prüfen, ob DNA einen Einfluss auf das Gast-Wirt-System oder auf die Fluoreszenzeigenschaften von Pyronin B ausübt, wurden Kontrollexperimente durchgeführt. Hierfür wurde zunächst Pyronin B in einer Konzentration von $10 \mu\text{M}$ vorgelegt und unmodifizierte, doppelsträngige DNA (DNA-ds1) bis zu einer Konzentration von $200 \mu\text{M}$ hinzutitriert. Hierbei konnte kein Einfluss auf das Fluoreszenzverhalten des Pyronin B's in Abhängigkeit der DNA-Konzentration beobachtet werden (Abbildung 36 A). Im nächsten Experiment wurde Pyronin B in einer Konzentration von $10 \mu\text{M}$ und monovalent CB[7]-modifizierte DNA (CB-kontrolle-1) in einer Konzentration von $10 \mu\text{M}$ vorgelegt. Anschließend wurde wieder doppelsträngige DNA hinzutitriert. Bis zu einer Konzentration von $50 \mu\text{M}$ der DNA bleibt die Fluoreszenzintensität von Pyronin B konstant. Bei höheren Konzentrationen ($> 50 \mu\text{M}$) wurde jedoch ein Abfall in der Pyronin B-Fluoreszenzintensität beobachtet (Abbildung 36 B). Folglich müssen alle Messungen unter einer Konzentration von $50 \mu\text{M}$ DNA durchgeführt werden.

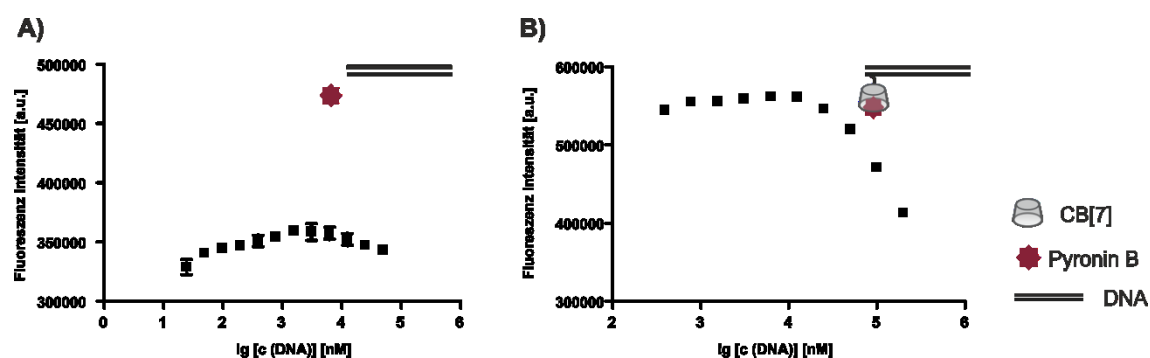


Abbildung 36: **A)** Fluoreszenzintensität von Pyronin B in Abhängigkeit der DNA-Konzentration (DNA-ds1). Bedingungen: Pyronin B $10 \mu\text{M}$, Phosphatpuffer: $10 \text{ mM NaH}_2\text{PO}_4$, 5 mM MgCl_2 , pH 7.5. **B)** Fluoreszenzintensität von an CB[7]-DNA gebundenem (CB-kontrolle-1) Pyronin B in Abhängigkeit der DNA-Konzentration. Bedingungen: $10 \mu\text{M}$ Pyronin B, $10 \mu\text{M}$ CB[7]-DNA, Phosphatpuffer: $10 \text{ mM NaH}_2\text{PO}_4$, 5 mM MgCl_2 , pH 7.5. Die DNA-Sequenzen sind in Tabelle 7 beschrieben.

Die im nächsten Abschnitt diskutierten Komplexe unterscheiden sich in Templatlänge und Flexibilität. In Abbildung 37 A sind monovalente und bivalente Komplexe darge-

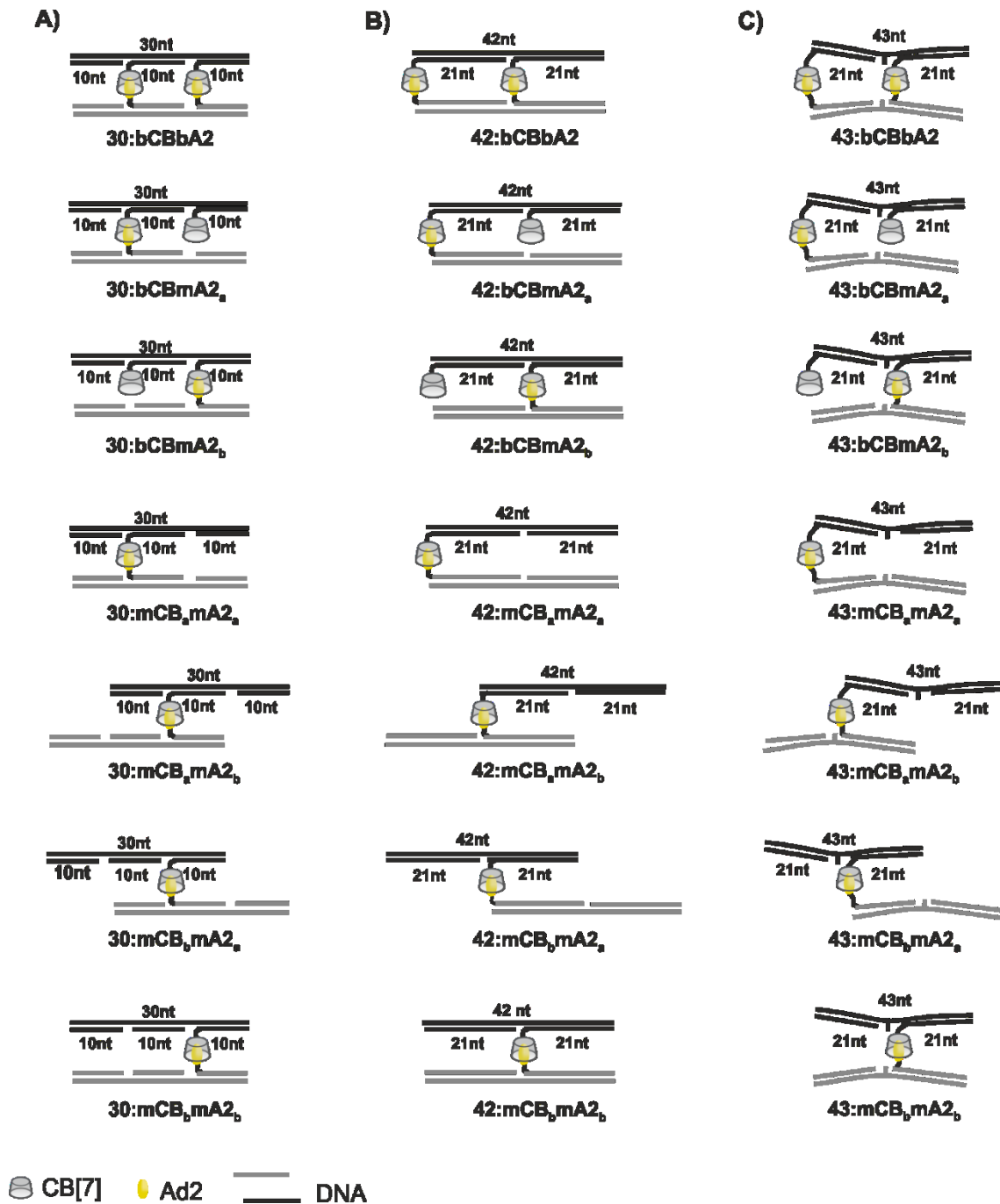


Abbildung 37: Modellkomplexe für das Verdrängungsexperiment mit Pyronin B. **A)** Komplexe aus einem 30 nt langen Templat und 10 nt langem Rezeptor- (CB1-CB4) bzw. Ligandkonjugaten (Ad2-1-Ad2-4), die nach der Hybridisierung monovalente und bivalente rigide Modellkomplexe ausbilden. Gast: Ad2, Wirt: CB[7]. **B)** 42 nt lange Template und 21 nt lange modifizierte DNA, die nach der Hybridisierung monovalente und bivalente rigide Modellkomplexe ausbilden. Gast: Ad2, Wirt: CB[7]. **C)** 43 nt lange Template und 21 nt lange modifizierte DNA, die nach der Hybridisierung monovalente und bivalente flexible Modellkomplexe ausbilden. Gast: Ad2, Wirt: CB[7]. 30, 42 und 43 stehen für die Länge der Template, m = monovalent, b = bivalent, A2 = Ad2-modifizierte DNA, CB = CB[7], a und b stehen für die verschiedenen modifizierten Stränge. Die DNA-Sequenzen sind in Tabelle 7 beschrieben.

stellt, die eine Templatlänge von 30 Nukleotiden beinhalten. Die modifizierten Stränge besitzen eine Länge von nur 10 nt. Allerdings besitzen diese Komplexe, im Vergleich zu den bisher genutzten, den Vorteil, dass sowohl die Gastmoleküle als auch die Wirte die gleiche sterische Umgebung aufweisen. Alle Gäste und Wirte befinden sich in der Mitte der DNA-Doppelstränge. Die modifizierten DNA-Stränge sind relativ kurz, deshalb sollten die erhaltenen Werte mit Komplexen verglichen werden, die aus längeren modifizierten CB[7]-DNA-Strängen (21 nt) und Adn-DNA-Strängen (21 nt) bestehen (Abbildung 37 B). Die längeren Oligonukleotide sollten einen höheren Schmelzpunkt besitzen und gewährleisten, dass auch bei relativ geringen Konzentrationen eine Doppelstrangstruktur ausgebildet wird. Um zu überprüfen, ob Doppelstrangstrukturen bei Raumtemperatur vorliegen, wurden Denaturierungsexperimente durchgeführt und ergaben Schmelztemperaturen über 40 °C für die 10 nt langen Komplexe und Schmelztemperaturen über 68 °C für die 21 nt langen Komplexe. Weiterhin sollte auch hier der Einfluss der Gerüst-Flexibilität untersucht werden, indem Komplexe vorbereitet wurden, die jeweils ein ungepaartes Nukleotid in der Mitte des DNA-Doppelstrangs aufweisen (Abbildung 37 C), denn es bestand die Möglichkeit, dass die Konstrukte nur dann bivalent binden können, wenn das DNA-Gerüst nicht vollkommen rigide ist. Für alle Konstrukte (30 nt, 42 nt und 43 nt) sollten jeweils auch die monovalenten Analoga untersucht werden. Da die Zugabe von BSA zu großen Schwankungen der IC₅₀-Werte für die Rhodamin B/CB[7]-Komplexe geführt hat, wurden diese Messungen ohne BSA durchgeführt. Die Magnesiumkonzentration wurde bei 10 mM MgCl₂ belassen.

In Abbildung 38 sind die erhaltenen IC₅₀-Werte in einem Balkendiagramm dargestellt. Für die Messungen wurde zunächst entweder der monovalente oder der bivalente CB[7]-Komplex in einer Konzentration von 1 µM zusammen mit Pyronin B (200 nM) vorgelegt und die Fluoreszenzintensität von Pyronin B bei verschiedenen Konzentrationen von entweder monovalenten oder bivalenten Ad2-Komplexen mit dem Plattenlesegerät ausgelesen. Es lässt sich erkennen, dass auch bei diesem Bindungssystem keine Bindungsverstärkung nachgewiesen werden konnte, obwohl deutlich niedrigere Konzentrationen von Pyronin B und CB[7]-DNA eingesetzt wurden. Beide rigide Konstrukte, (schwarze Balken: 30 nt und graue Balken: 42 nt, Abbildung 38) zeigen den gleichen Trend. Wenn bivalente CB[7]-DNA vorgelegt wird und Pyronin B mit monovalenter Ad2-DNA verdrängt wird (**30:bCBmA2_a**, **30:bCBmA2_b**, **42:bCBmA2_a**, **42:bCBmA2_b**), so steigt der

IC50-Wert auf etwa das Doppelte im Vergleich zum bivalenten Konstrukt an. Dies kann auf einen Konzentrationseffekt zurückgeführt werden, da beim bivalenten CB[7]-DNA-Konjugat doppelt so viele Adamantane benötigt werden, um alle Pyronin B-Moleküle aus den Käfigen zu verdrängen. Wird monovalente CB[7]-DNA vorgelegt und mit monovalenter Ad2-DNA (**30:mCB_amA2_a**, **30:mCB_amA2_b**, **30:mCB_bmA2_a**, **30:mCB_bmA2_b**, **42:mCB_amA2_a**, **42:mCB_amA2_b**, **42:mCB_bmA2_a**, **42:mCB_bmA2_b**) verdrängt, so bleibt der erhaltene IC50-Wert ungefähr so groß, wie der bivalente IC50-Wert. Es zeigt sich weiterhin, dass alle Bindungsstellen etwa gleichwertig sind, da sich die Werte für die unterschiedlichen monovalenten Werte nicht signifikant unterscheiden. Bei dem flexiblen Konstrukt zeigt sich mehr oder weniger der gleiche Trend, nur dass die IC50-Werte hier stärker schwanken. Ein relativ hoher IC50-Wert wurde für den Komplex **43:mCB_bmA2_b**, bei dem sowohl der Gast, als auch der Wirt in der Mitte des DNA-Doppelstranges angebracht sind, erhalten. Dieser Wert ist in etwa doppelt so hoch (1.00 µM), wie die Werte für die anderen monovalenten Konstrukte mit jeweils nur einer Modifikation (**43:mCB_bmA2_a**, **43:mCB_amA2_b**, **43:mCB_amA2_a**, 0.23-0.61 µM). Jedoch besteht ein viel zu geringer Unterschied des IC50-Werts im Vergleich zu dem bivalenten Konstrukt,

um von einer exponentiellen Verstärkung sprechen zu können. Es konnten lediglich Konzentrationseffekte beobachtet werden. Bei diesen Messungen konnte für das Fehlen des bivalenten Effekts mehrere Ursachen ausgeschlossen werden, wie die Flexibilität der Konstrukte, eine mögliche Rückbindung, nicht äquivalente Binder oder auch eine zu niedrige Schmelztemperatur. Wie bereits in Abschnitt 4.1.6 erwähnt, könnte der Grund für den fehlenden Bivalenzeffekt in der zu hohen Bindungsaffinität des Adamantans für Cucurbit[7]uril im Vergleich zu dem zu verdrängenden Pyronin B liegen.

IC₅₀ Werte sind abhängig von der Konzentration der beteiligten Bindungspartner. Liegen Wirt und/oder der zu verdrängende Gast in hoher Konzentration vor, resultieren hohe IC₅₀-Werte. Wenn die zu verdrängende Komponente (in diesem Fall Pyronin B) eine viel geringere Bindungsaffinität zum Wirt als die Komponente hat, mit der verdrängt wird (in diesem Fall Ad2-DNA), so wird bei hohen Konzentrationen der monovalente Binder genauso gut verdrängen, wie der bivalente Binder und es lässt sich nur ein Konzentrations-effekt beobachten. Diese Annahme wurde auch von Susanne Liese aus dem AK Netz in theoretischen Studien untersucht und ist im Anhang (Abschnitt 7.3) zusammengefasst.

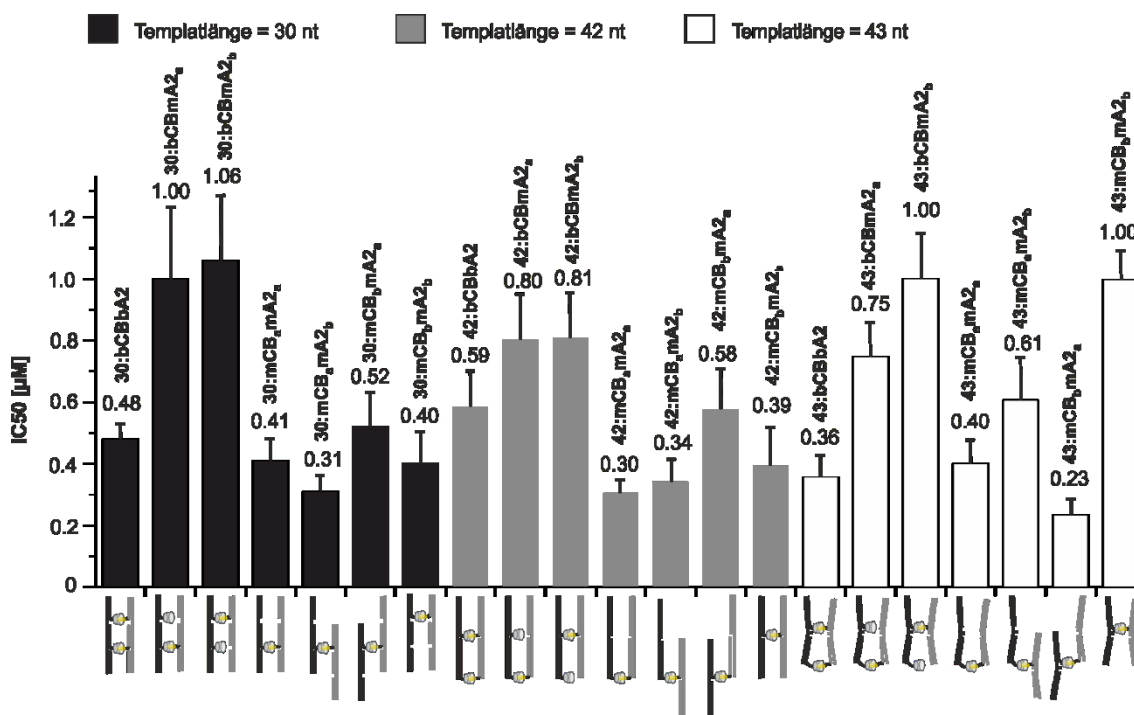


Abbildung 38: IC₅₀-Werte für die Verdrängung mit Pyronin B aus CB[7]-DNA-Konjugaten bei Zugaben von Ad2-DNA-Konjugaten. Schwarze Balken: 30 nt Templatlänge, graue Balken: 42 nt Templatlänge, weiße Balken: 43 nt Templatlänge. Bedingungen: 200 nM Pyronin B, 1 μM CB[7]-DNA, 0-20 μM Ad2-DNA, 10 mM NaH₂PO₄, 10 mM MgCl₂ pH 7.5. m = monovalent, b = bivalent, CB = Cucurbit[7]uril, A2 = Amantadin-modifiziert (Ad2), a und b stehen für die verschiedenen modifizierten DNA-Sequenzen.

4.1.8 Bindungsaffinitäten zwischen CB[7]-DNA und Admantyl-DNA

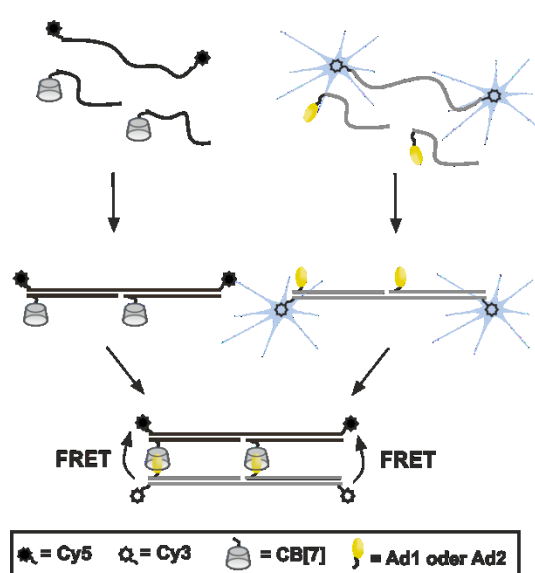


Abbildung 39: Hybridisierung der modifizierten DNA mit den entsprechenden Templaten. Bei einer Bindung der Wirt-modifizierten DNA an die Gast-modifizierte DNA, kann durch den FRET-Effekt die Bindungskonstante bestimmt werden.

bessert wurde. Das Cy5/Cy3-FRET Paar wurde ausgewählt, da laut Literatur CB[7] nicht an Cy5 bindet.⁷⁸ Da Cy3 eine sehr ähnliche chemische Struktur wie Cy5 besitzt, wurde davon ausgegangen, dass auch dieser Farbstoff keinen Gast-Wirt-Komplex mit CB[7] ausbildet. Auch wurde dieses FRET-Paar bereits in Kombination mit Adamantan und CB[7] verwendet.⁹⁸

Bivalente CB[7]-Komplexe wurden durch Hybridisierung zweier CB[7]-DNA-Konjugate mit verschiedenen Templaten, die am 5'- und am 3'-Ende Cy5-Fluorophore trugen, erhalten. In derselben Art und Weise wurden auch die Ligandkomplexe erhalten, indem zwei Adamantan-DNA-Konjugate mit Templaten, die an beiden Enden mit Cy3 modifiziert waren, hybridisiert wurden. Auch hier wurden die beiden Admantanderivate Ad1 und Ad2 verwendet, um unterschiedliche monovalente Bindungsaffinitäten zu untersuchen. Beispielsweise repräsentieren die bivalenten CB[7]-Adamantankomplexe **bCAn₂₁** und **bCAn₃₁** einen Bindungsabstand von 21 bzw. 31 nt zwischen den beiden Gast-Wirt-Paaren. Um den Einfluss der Flexibilität des DNA-Gerüsts auf die bivalente Bindungs-

Eine Möglichkeit, die Bindung zwischen zwei Molekülen zu verfolgen, bietet der FRET-Effekt. Hierfür wurde ein Template für die CB[7]-modifizierte DNA, welches sowohl am 5'-, als auch am 3'-Ende mit einem Cy5-Farbstoff markiert war und ein Template für die Adamantan-modifizierte DNA, welches am 5'- und am 3'-Ende mit Cy3-Farbstoff markiert war, verwendet (Abbildung 39). Diese Template konnten kommerziell erhalten werden. Die doppelte Markierung der DNA mit einem Fluoreszenzfarbstoff ermöglichte Messungen auch bei sehr geringen Konzentrationen, da dadurch das Signal/Rausch-Verhältnis ver-

4.1 Untersuchungen zur Reichweite der Bivalenz

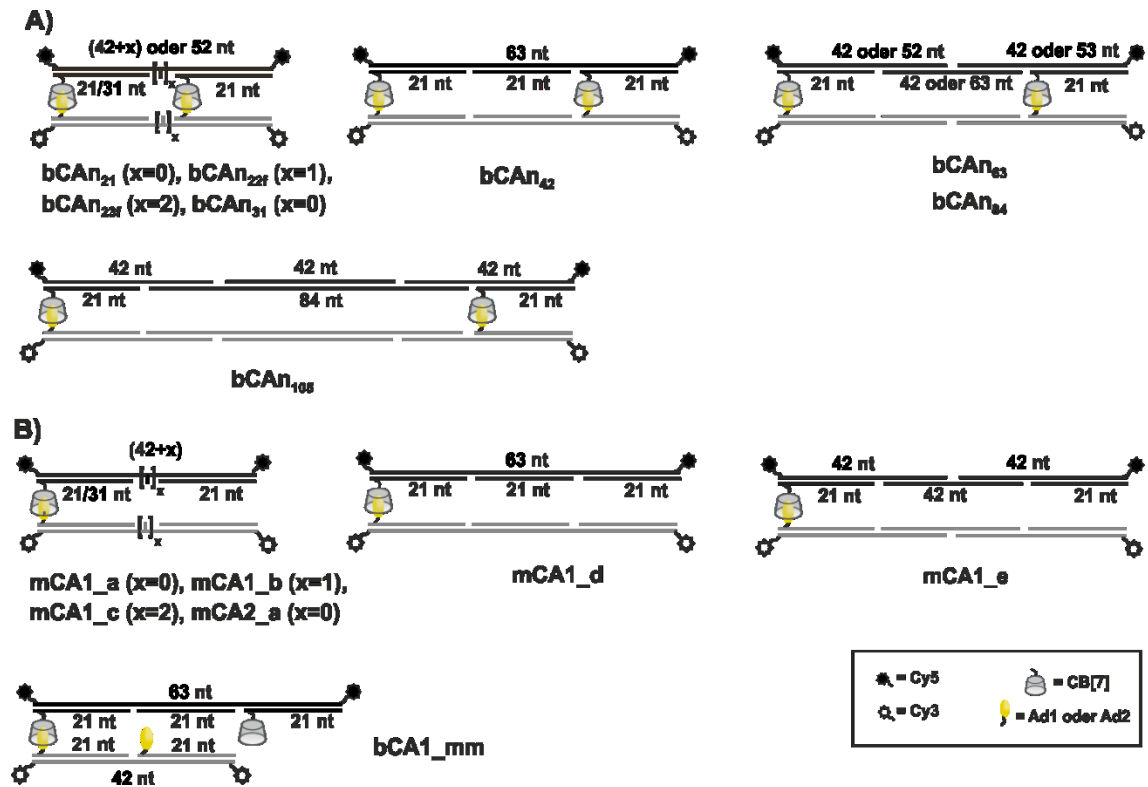


Abbildung 40: A) Bivalente Bindungssysteme **bCAN_y** setzen sich zusammen aus bivalenten CB[7]-Komplexen (schwarz) und Adn-Komplexen (grau) (Adn = **Ad1** oder **Ad2**), b steht für bivalent, m steht für monovalent, C steht für CB[7], An steht für das Adamantanderivat, wobei n = 1 (Ad1) oder n = 2 (Ad2). Der Index y steht für die Anzahl der Nukleotide zwischen den Gast-Wirt-Komplexen. B) Monovalente Bindungssysteme **mCAN** und das fehlangepasste bivalente System **bCA2-mm**, welches Kontrollexperimente ermöglicht. Alle Komplexe wurden aus en Konjugaten CB3-5, Ad1-3-5 und Ad2-3-5 hergestellt. Die DNA-Sequenzen sind in Tabelle 7 beschrieben.

stärke zu untersuchen, wurden Komplexe hergestellt, die entweder ein oder zwei ungepaarte Nukleotide in der Mitte des DNA-Komplexes trugen (**bCAN_{22f}** und **bCAN_{23f}**). Für einen Abstand von 42 nt (ca. 143 Å) wurden 63 nt lange Template verwendet und die Komplexe mit einem zusätzlichen 21 nt langen Templat in der Mitte rigidifiziert **bCAN₄₂**. Um den Abstand noch weiter zu erhöhen, wurden die Cy-markierten Template aufgeteilt und ein 5'-markiertes 42mer mit einem 3'-markiertem 42mer durch ein 42 nt langes Templat miteinander verknüpft. Die Hybridisierung der 21 nt langen CB[7]- und Adamantan-DNA mit den beschriebenen Templaten, führten zu einem 63 nt langen Abstand der Gast-Wirt-Komplexe (**bCAN₆₃**, ca. 215 Å). Analog dazu wurden auch die beiden Abstände von 84 und 105 nt realisiert (**bCAN₈₄** und **bCAN₁₀₅**). Für Kontrollexperimente wurden die monovalenten Komplexe **bCAN_a- bCAN_e** und der Komplex **bCA1_mm**, der nicht zueinander passende Abstände der Rezeptoren und Liganden beinhaltet, hergestellt (Abbildung 40). Vor den Messungen der Bindungsaffinitäten, wurden die Schmelztemperaturen der einzelnen Komplexe bestimmt. Dafür wurden die Komplexe auf 90 °C

4.1 Untersuchungen zur Reichweite der Bivalenz

erhitzt, mit einer Rate von 1 K/min auf 20 °C abgekühlt und die Absorption der DNA vermessen. In Abbildung 41 sind Beispiele für Denaturierungskurven eines bivalenten Ad1-, Ad2- und eines CB[7]-Komplexes gezeigt. Alle hier verwendeten Modellkomplexe wiesen Schmelztemperaturen von über 68 °C auf. Somit konnte davon ausgegangen werden, dass bei den Bedingungen, bei denen die Affinitätsmessungen durchgeführt werden

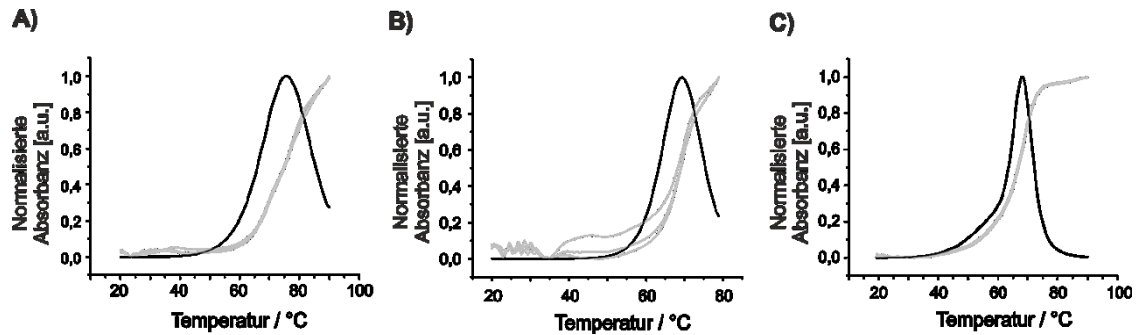


Abbildung 41: Thermale Denaturierungskurven (graue Linien) und deren erste mittlere Ableitungen (schwarze Linien) der Komplexe **bA1₂₁** (A), **bA2₂₁** (B) und **bC₂₁** (C). Die Spektren wurden bei 260 nm aufgenommen.

sollten, alle Komplexe im Doppelstrang vorliegen.

Für die Messungen wurden Komplexe verwendet, die aus bis zu fünf verschiedenen DNA-Einzelsträngen bestanden. Die Ausbildung dieser Komplexe wurde mit einem nativen Gel beispielhaft für zwei Ad2-Komplexe überprüft (Abbildung 42). Dafür wurden zwei verschiedene Ad2-Komplexe (**bA2₂₁** und **bA2₆₃**) in Phosphatpuffer hybridisiert, als Kontrolle auch die entsprechenden Template auf ein Gel aufgetragen und eine native Gel-elektrophorese durchgeführt. Das Gel zeigt eine Komplexbildung durch die Verschiebung der Banden. Der kürzere Komplex **bA2₂₁** gibt nur eine Bande im Bereich zwischen 35 pb und 50 bp. Die Bande für den längeren Komplex befindet sich im Bereich 50 pb – 100 bp.

Als nächstes sollten die Bindungsaffinitäten bestimmt werden. Dafür wurde die Adn-

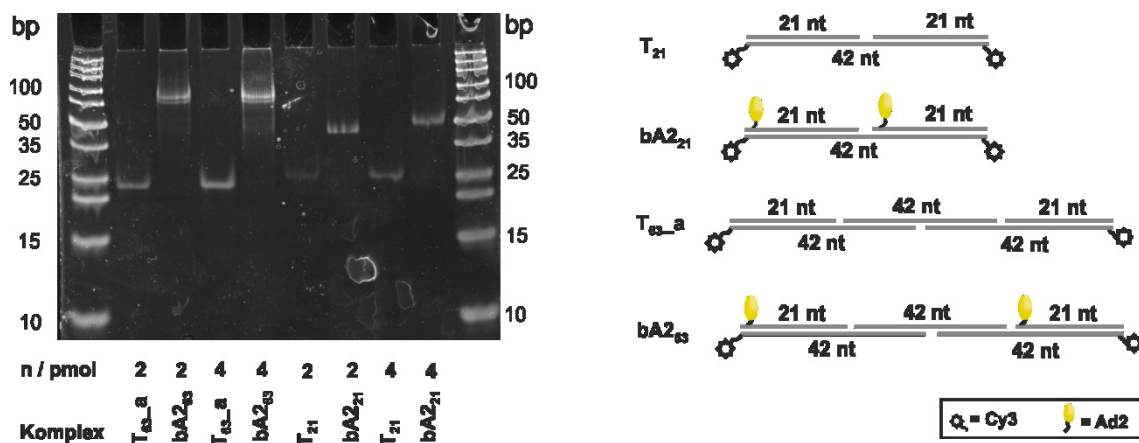


Abbildung 42: Natives Acrylamidgel (20%) der Komplexe **bA2₂₁** und **bA2₆₃**. Bedingungen: 100 V, 4 h, RT.

DNA in einer Konzentration von 10 nM vorgelegt und CB[7]-DNA in verschiedenen Konzentrationen hinzugegeben. Bei einer Bindung der Gast- und der Wirt-modifizierten DNA kommt es zu einer Annäherung der Cy3- und Cy5-Farbstoffe und die Fluoreszenzintensität von Cy3 sollte durch den FRET-Effekt sinken. Durch die Messung der Gast-Komponente bei verschiedenen Konzentrationen der Wirt-Komponente sollte eine sigmoidale Bindungskurve erhalten und durch eine entsprechende nicht-lineare Regression Bindungsaffinitäten bestimmt werden.

Zunächst wurde geprüft, ob die Zugabe von doppelsträngiger Cy5-DNA, die keine CB[7]-Modifikation beinhaltet, eine Änderung der Cy3-Fluoreszenzintensität verursacht. Hierzu wurde **Ad1-DNA** in einer Konzentration von 10 nM vorgelegt und Cy5-modifizierte doppelsträngige DNA in verschiedenen Konzentrationen hinzugegeben (Abbildung 43). Dabei konnte beobachtet werden, dass bis zu einer Konzentration von 2 μM keine signifikante Änderung der Cy3-Fluoreszenzintensität hervorgerufen wird. Damit konnte ausgeschlossen werden, dass Änderungen der Cy3-Fluoreszenzintensität durch Bindung an DNA hervorgerufen werden.

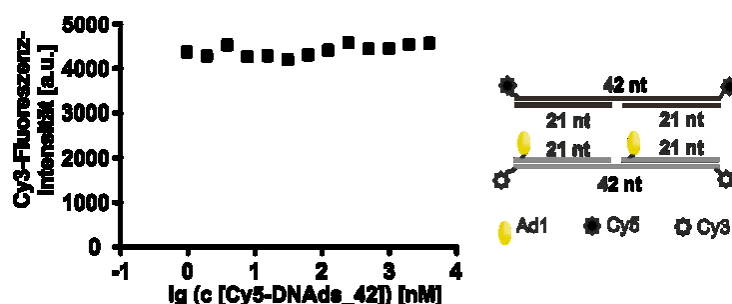


Abbildung 43: Fluoreszenzintensität von Ad1-modifizierter Cy3-DNA in Abhängigkeit der Konzentration der Cy5-modifizierten DNA. Bedingungen: $c(\text{ADN-DNA}) = 10 \text{ nM}$, Phosphatpuffer: 10 mM NaH_2PO_4 , 5 mM MgCl_2 , pH 7.5.

Anschließend wurden die Bindungsaffinitäten der monovalenten Interaktion zwischen Adn-DNA und CB[7]-DNA bestimmt. In der Literatur besitzt Adamantanethyldiamin eine höhere Bindungsaffinität zu CB[7] als Amantadin. Dies spiegelt sich auch bei den hier durchgeführten Messungen wieder, denn der monovalente Komplex **mCA1_a** (66.4 nM) weist eine etwa zehnmal höhere Bindungsaffinität auf, als **mCA2_a** (700 nM) (Abbildung 44). Freies Amantadin bzw. Adamantanethyldiamin bindet jedoch deutlich stärker an CB[7]. Die Anbringung der Adamantanamine und des CB[7] an DNA könnte zu einer Schwächung der Bindungsaffinität führen, denn dadurch ist das Gast-Wirt-

System sterisch gehinderter. Weiterhin könnte durch die negative Ladung der DNA-Doppelstränge eine gegenseitige Abstoßung vorliegen. Den größten Anteil an der Schwächung der Bindungsaffinität wird wahrscheinlich die chemische Strukturänderung der Admantanamine verursachen. Durch dessen Kupplung an DNA wurde jeweils ein Amin zum Amid umgesetzt. Die Amine tragen allerdings zu einer stärkeren Bindung an CB[7] bei, da sie Ion-Dipol-Wechselwirkungen zu den Carbonyl-Gruppen an der Außenseite des CB[7]-Käfigs ausbilden können. Durch das Fehlen eines Amins wird somit die Bindungsaffinität deutlich abgeschwächt.

Um den Einfluss des DNA-Gerüsts auf das Bindungsverhalten des Gast-Wirt-Komplexes auszuschließen, wurden mehrere monovalente Systeme des Binders Ad1 vermessen. Hierbei wurden nur die Länge und die Flexibilität der DNA-Doppelstränge variiert (Abbildung 44 A). Für alle fünf monovalenten Systeme (**mCA1_a-e**) wurden K_D -Werte im Bereich von 60 nM bestimmt, sodass ein Einfluss des DNA-Doppelstranges auf die

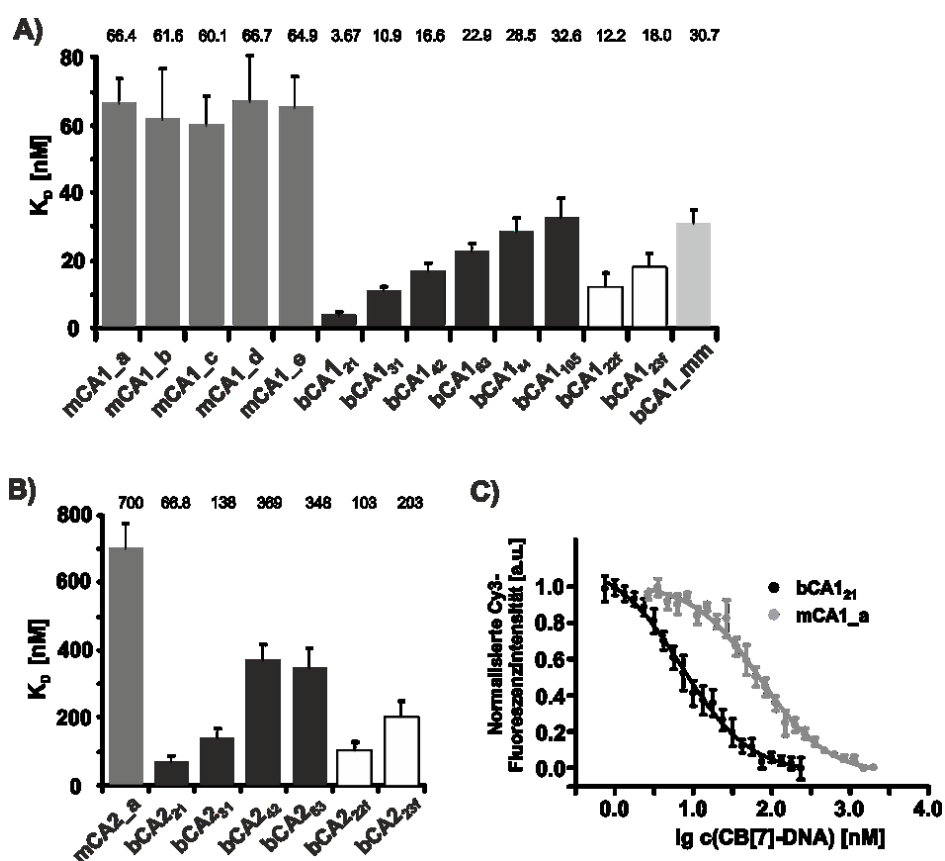


Abbildung 44: Dissoziationskonstanten (K_D [nM]) für Binder **A)** Ad1 und **B)** Ad2. Bedingungen: 10 nM Adn-DNA, 0-4 μ M CB[7]-DNA in Puffer (10 mM NaH_2PO_4 , 5 mM MgCl_2 , pH 7.5). **C)** Repräsentative Bindenisothermen für das monovalente System **mCA1_a** (grau) und **bCA1₂₁** (schwarz).

Bindungsaffinität ausgeschlossen werden konnte. Als Nächstes wurde ein Experiment durchgeführt, in dem der Ligandenabstand (Ad1) 21 nt, und der Rezeptorabstand (CB[7]) 42 nt betrug (**bCA1_{mm}**). Die hier erhaltene Dissoziationskonstante betrug 31 nM. Folglich konnte ein System, bei dem die beiden Liganden- und Rezeptorabstände nicht aufeinander abgestimmt sind, von keiner bivalenten Verstärkung profitieren.

Zunächst sollte ein bivalentes System mit einem relativ kleinen Abstand (21 nt) der Gast-Wirt-Bindungseinheiten untersucht werden. Hierbei wurde für Binder Ad1 (**bCA₂₁**) ein K_D -Wert von 3.7 nM erhalten. Dies bedeutet eine etwa 18-fache Verstärkung zum monovalenten Komplex **mCA1_a** und folglich eine erhebliche Verschiebung der Bindungsisothermen (Abbildung 44 C). Für den Komplex **bCA₂₁** wurde eine Bindungskonstante von nur 66.8 nM erhalten, was etwa zehnmal niedriger ist als für den monovalenten Fall **mCA1_a**. Folglich wurde für den stärkeren Binder Ad1 ein größerer bivalenten Effekt erhalten, als für den schwächeren Binder Ad2. Dies bedeutet, dass die Stärke der monovalenten Wechselwirkung einen signifikanten Einfluss auf die bivalente Verstärkung hat. Je stärker die monovalente Interaktion ist, umso höher ist der bivalente Effekt.

Nun sollte die Abhängigkeit der Bindungsstärke vom Abstand der Bindungspaare untersucht werden. Dafür wurde der Abstand der Gast-Wirt-Komplexe schrittweise erhöht. Bei einem Abstand von 31 nt sinkt die Bindungsaffinität für beide Binder (**bCA1₃₁** und **bCA2₃₁**) signifikant. Bei einem Abstand von 42 nt zeigt der schwächere Binder Ad2 bereits keinen bivalenten Effekt auf, da der K_D -Wert auf etwa die Hälfte im Vergleich zum monovalenten Fall (**mCA2_a**) sinkt. Der stärkere Binder Ad1 zeigt noch eine vierfach höhere Affinität bei einem Abstand von 42 nt (**bCA1₃₁**) als im monovalenten Fall (**mCA1_{a-e}**) auf. Erst bei einem Abstand größer als 84 nt sinkt die Bindungsaffinität auf 29-33 nM und somit auf etwa die Hälfte des monovalenten Falls. Es kann also geschlossen werden, dass der Bivalenzeffekt beim stärkeren Binder Ad1, im Gegensatz zum schwächeren Binder Ad2, noch bei viel größeren Abständen wirken kann.

Die Ergebnisse zeigen, dass der bivalente Effekt mit Zunahme des Abstands eines Rezeptor-Liganden-Paares abnimmt und diese Abnahme von der monovalenten Bindungsstärke abhängt. Liegt eine starke monovalente Interaktion vor, kann Multivalenz auch noch bei großen Abständen wirken. Schwache Binder hingegen können schon bei kürzeren Bindungsabständen nicht mehr synergetisch interagieren.

Als Nächstes sollte der Einfluss der Flexibilität des DNA-Gerüsts auf die Bindungsaffinitäten untersucht werden. Hierfür wurden längere Template verwendet, die entweder zu einem (**bCA1_{22f}** und **bCA1_{22f}**) oder zu zwei ungepaarten Nukleotiden (**bCA1_{23f}** und **bCA1_{23f}**) in der Mitte der DNA-Doppelstränge führten. Beide Modellkomplexe (Ad1 und Ad2) verloren an Stabilität (Abbildung 44 A und B). Bei zwei ungepaarten Nukleotiden sank die Bindungsaffinität noch weiter. In der Literatur sind bereits bivalente Systeme beschrieben, bei denen eine Erhöhung der Flexibilität zu einem Affinitätsgewinn führte. In dem hier vorgestellten Modellsystem wurden jedoch die Liganden (hier Ad1 oder Ad2) und die Rezeptoren (hier CB[7]) an DNA-Doppelsträngen arrangiert, was zu einer linearen Anordnung führte. Somit ist keine Flexibilität des Gerüsts notwendig, damit in einem bivalenten System beide Rezeptoren beide Liganden (hier Ad1 oder Ad2) binden können. Bindet ein flexibler bivalenter Ligand an einen flexiblen bivalenten Rezeptor, so liegt eine höhere Diskrepanz des Entropiezustandes zwischen Anfangs- und Endzustand vor, als bei der Bindung eines rigiden Liganden an einen rigiden Rezeptor. Eine Erhöhung der Gerüstflexibilität führt zu einem höheren Entropieunterschied und somit zu einer schwächeren Bindung.

Der nächste Abschnitt beschreibt ein Experiment, bei dem der Templatanteil der CB[7]-Komponente von 100% auf bis zu 180% erhöht wurde. Bei zu hohen Templatkonzentrationen liegen nicht nur bivalente, sondern auch monovalente Systeme vor, je mehr Cy5-Templat im Vergleich zur CB[7]-DNA vorliegt, desto mehr monovalente Komplexe befinden sich in Lösung, da sich die modifizierte CB[7]-DNA gleichmäßig auf die Template verteilt. Folglich sollte bei Erhöhung des Templatanteils die Bindungsaffinität sinken. Abbildung 45 zeigt genau diesen Trend. Je höher der Templatanteil, desto höher ist auch der K_D -Wert. Bei 180% Templatanteil sind kaum noch bivalente CB[7]-Komplexe in Lösung vorhanden und der K_D -Wert sinkt

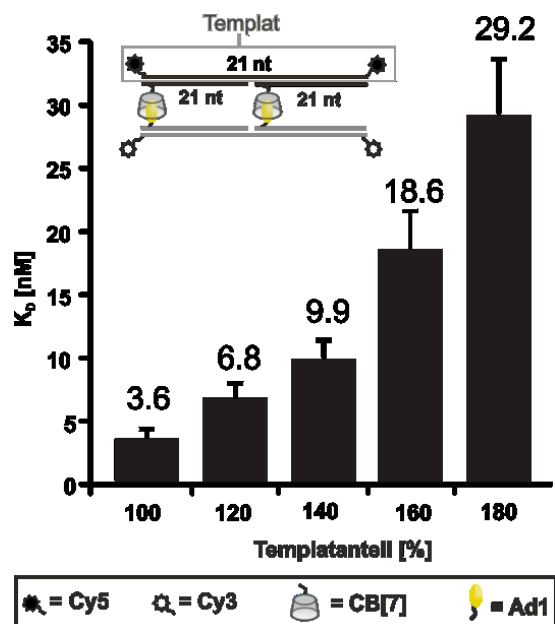


Abbildung 45: K_D -Werte [nM] bei unterschiedlichen Cy5-Templatkonzentrationen. Bedingungen: 10 nM Ad1-DNA und 0-2 mM CB[7]-DNA in Phosphatpuffer: 10 mM NaH_2PO_4 , 5 mM MgCl_2 , pH 7.5.

tionen liegen nicht nur bivalente, sondern auch monovalente Systeme vor, je mehr Cy5-Templat im Vergleich zur CB[7]-DNA vorliegt, desto mehr monovalente Komplexe befinden sich in Lösung, da sich die modifizierte CB[7]-DNA gleichmäßig auf die Template verteilt. Folglich sollte bei Erhöhung des Templatanteils die Bindungsaffinität sinken. Abbildung 45 zeigt genau diesen Trend. Je höher der Templatanteil, desto höher ist auch der K_D -Wert. Bei 180% Templatanteil sind kaum noch bivalente CB[7]-Komplexe in Lösung vorhanden und der K_D -Wert sinkt

4.1 Untersuchungen zur Reichweite der Bivalenz

auf etwa die Hälfte (29.4 nM) des monovalenten Werts (66.4 nM). Dieses Experiment bestätigt, dass die bei diesen Experimenten erhaltene bivalente Verstärkung nur vorliegen kann, wenn bivalente Komplexe vorliegen.

4.1.9 Theoretische Berechnungen zur Reichweite der Bivalenz

Im vorangegangenen Abschnitt konnte gezeigt werden, dass es eine Grenze der Bivalenz gibt, die zum einen vom Abstand der Binder und der Flexibilität des Gerüsts und zum anderen von der Stärke der monovalenten Bindung abhängt. Um diese Ergebnisse zu generalisieren, wurde von Susanne Liese aus dem AK Netz (Berlin) die bivalente Interaktion zwischen rigiden, polymeren Ligand/Rezeptor-Komplexen modelliert. Dieses Modell ermöglichte eine Analyse der Zunahme der Bindungsenergie ΔG_{gain} , die bei der Ausbildung bivalenter Komplexe im Vergleich zu monovalenten Komplexen frei wird.¹⁸¹

Abbildung 46 zeigt den Energiegewinn ΔG_{gain} für zwei verschiedene DNA-basierende Ligandentypen mit einer Persistenzlänge von 530 Å und zwei verschiedenen monovalenten K_D -Werten. Weiterhin werden drei verschiedene mögliche Fälle der Interaktion verglichen: (1) keine Interaktionsenergie (gestrichelte Linie), (2) attraktive Wechselwirkung (gepunktete Linie), (3) repulsive Wechselwirkung (durchgezogene Linie). Aus Formel (2) und auch aus Abbildung 46 lässt sich erkennen, dass die effektive Konzentration und der

Energiegewinn ΔG_{gain} vom Bindungsabstand d abhängt.

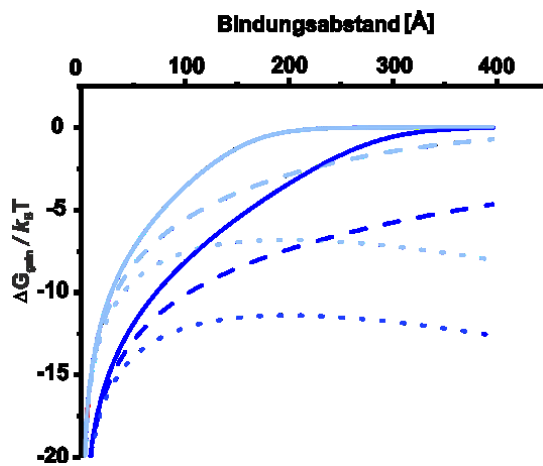


Abbildung 46: Abhängigkeit des Energiegewinns ΔG_{gain} in Abhängigkeit des Bindungsabstands d für zwei verschiedene monovalente K_D -Werte. Der Ligand wurde als eine harmonische Feder mit einem mittleren Abstand d (äquivalent zu dem Bindungsabstand) und der mittleren Längenfluktuation (repräsentiert die Flexibilität des Systems) betrachtet. Dunkelblaue Linien: $K_D = 0.1 \mu\text{M}$, hellblaue Linien: $K_D = 10 \mu\text{M}$, gepunktete Linien: attraktive Wechselwirkung, durchgezogene Linien: repulsive Wechselwirkung, gestrichelte Linien: keine Wechselwirkung.

Weiterhin zeigt sich, dass die bivalente Verstärkung nicht nur von der effektiven Konzentration (c_{eff}), sondern auch von der monovalenten Bindungskonstante (K_{mono}) abhängt. Schwache Bindungspartner erreichen $\Delta G_{\text{gain}} = 0$ bei kleineren Bindungsabständen als stärkere Bindungspartner. Die Berechnungen zeigen, dass die Abstandsabhängigkeit des Bivalenzeffekts ein generelles Phänomen darstellt. Frühere Simulationen legten dar, dass nur die monovalente Dissoziationskonstante die bivalente Verstärkung bestimmt. Die Resultate dieser Simulationen bringen jedoch hervor, dass nicht nur die

monovalente Dissoziationskonstante die maximal mögliche Verstärkung bestimmt, sondern auch die Reichweite, wenn ΔG_{gain} den Wert Null erreicht.

Die Berechnungen zeigen auch den Einfluss der potentiellen Interaktionen der Gerüste. Attraktive Wechselwirkungen können sogar dazu führen, dass ΔG_{gain} nie den Wert Null erreicht. In dem in Kapitel 4.1.9 beschriebenen Experimenten wurde allerdings eine Grenze der bivalenten Verstärkung erreicht. DNA_{ds}-DNA_{ds}-Abstoßung wurde hier durch eine Zugabe von 5 mM Magnesiumchlorid minimiert. Aufgrund der Tatsache, dass eine Grenze erreicht wurde, kann nicht davon ausgegangen werden, dass die Magnesiumkonzentration zu einer attraktiven Wechselwirkung der DNA-Doppelstränge führte.

4.2 Untersuchungen zu multimolekularen Bindungsmodi

Bivalente Systeme können entweder bimolekular oder multimolekular (verbrückend) binden (Abbildung 47). Damit multimolekulare Bindungsweisen stattfinden können, müssen solche Systeme eine bivalente Verstärkung umgehen können. Es gibt Beispiele, wie Adapterproteine, Intersectin oder Clathrin, in denen bivalente Systeme multimolekular binden und sogenannte quervernetzte Strukturen ausbilden. Dieses Kapitel beschäftigt

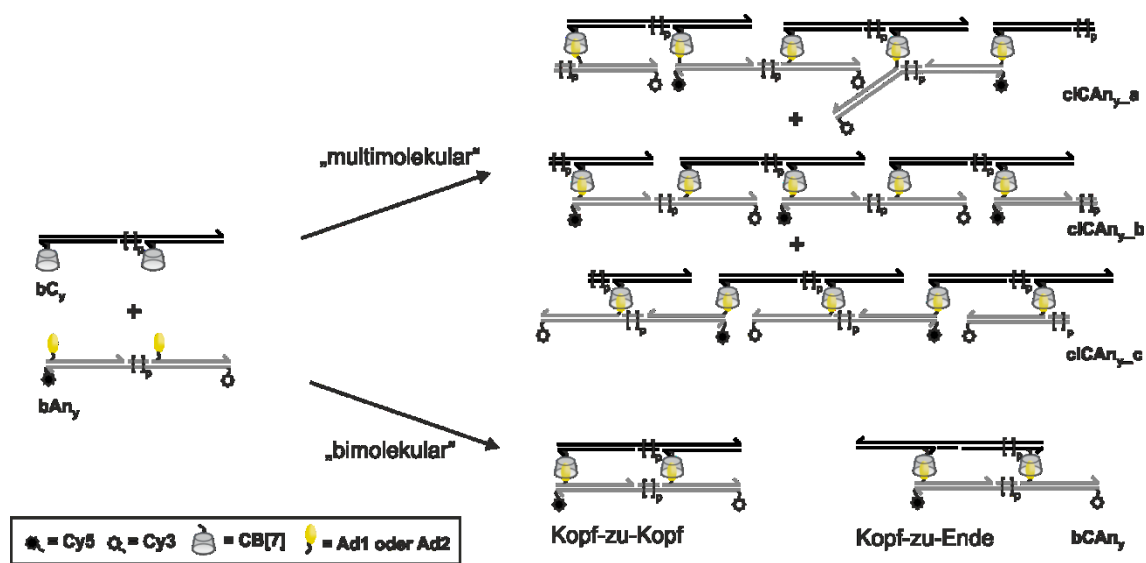


Abbildung 47: Ausbildung bimolekularer und multimolekularer Strukturen. Bei der multimolekularen Bindungsweise gibt es drei verschiedene Möglichkeiten: die Kopf-zu-Kopf-Anordnungen cICAn_b und Kopf-zu-Ende-Anordnungen cICAn_c und eine Mischung der beiden Anordnungen cICAn_a . Bimolekulare Wechselwirkungen führen zu Komplexen mit einer Kopf-zu-Kopf oder einer Kopf-zu-Ende Orientierung bCn . Pfeilrichtung: 5' → 3'.

sich mit der Fragestellung, welche Bedingungen dazu führen, dass Bindungssysteme trotz möglicher bivalenter Bindungsweise verbrückende Komplexe ausbilden. Es liegt zunächst nahe, dass der Bindungsmodus (bimolekular oder multimolekular) von der Konzentration abhängt. Weiterhin könnten Faktoren, wie beispielsweise, die Bindungsstärke der monovalenten Interaktion, der Abstand beider Binder und die Flexibilität des Gerüsts eine Rolle spielen. Bei den vorher beschriebenen Messungen wurde davon ausgegangen, dass das System bimolekular bindet, da nur sehr geringe Konzentrationen verwendet wurden. Ein Beweis hierfür wurde jedoch noch nicht erbracht. Um dies genauer zu untersuchen, wurde ein System benötigt, welches die Bildung multimolekularer Komplexe

anzeigen kann. Dafür wurde die Fluoreszenzmarkierung der Templatstränge geändert (Abbildung 47). Für das CB[7] wurde diesmal ein Templat verwendet, an dem keine Fluoreszenzfarbstoffe angebracht waren. Das Templat für die Adamantyl-modifizierte DNA hingegen trug am 5'-Ende ein Cy3- und am 3'-Ende ein Cy5-Fluorophor. Bei einer bimolekularen Bindung **bCAn_y** sollte kein FRET-Effekt beobachtbar sein. Bei einer multimolekularen Bindung **clCAn_y** würden beide Cy-Farbstoffe in räumliche Nähe zueinander gebracht werden und die Fluoreszenzintensität von Cy3 sollte sinken (Abbildung 47 A). Hierbei können drei verschiedene Varianten auftreten. Zum einen kann entweder eine Kopf-zu-Ende-Anordnung (**clCAn_y_b**) oder eine Ende-zu-Kopf-Anordnung (**clCAn_y_c**) auftreten. Diese Anordnungen würden einen hohen FRET-Effekt verursachen. Allerdings könnte als dritte Möglichkeit, eine Mischung der beiden Varianten (**clCAn_y_a**), realisiert werden. In dieser Anordnung wird die Anzahl der Cy3/Cy5-Paare, die in einem geringen Abstand angeordnet werden, verringert. Die durch FRET bewirkte Minderung der Cy3-Emission sollte geringer ausfallen, als bei den erstgenannten Varianten.

Zunächst sollte jedoch gezeigt werden, dass die Komplexe bei den Bedingungen, die für die Affinitätsmessungen, die in Kapitel 4.1.9 genutzt worden sind, bimolekular binden. Dazu wurden mehrere bivalente Systeme betrachtet. Es wurden beide Liganden Ad1 und Ad2 mit jeweils zwei unterschiedlichen Bindungsabständen (21 nt und 63 nt) vermessen. Die Adn-DNA wurde in einer Konzentration von 10 nM vorgelegt, die nicht markierten bivalenten CB[7]-DNA-Komplexe in verschiedenen Konzentrationen (0-4 mM) hinzugegeben und die Fluoreszenzintensität von Cy3 ausgelesen. Bei keiner der Messungen konnte eine signifikante Änderung der Cy3-Fluoreszenzintensität beobachtet werden (Abbildung 48). Somit kann davon ausgegangen werden, dass bei den Affinitätsmessungen die Komplexe bimolekular und nicht multimolekular binden. Als Nächstes sollte untersucht werden, ob Faktoren, wie Konzentration, Abstand der Bindungsmodule, Stärke der monovalenten Bindung und Flexibilität des Gerüsts, dazu führen können, dass ein bivalentes System verbrückend bindet. Es sollten beide Liganden (Ad1 und Ad2) und zwei unterschiedliche Abstände (21 nt und 84 nt) untersucht werden. Des Weiteren sollte ein System mit erhöhter Flexibilität betrachtet werden. Dafür wurden Komplexe mit zwei ungepaarten Nukleotiden vorbereitet.

Um eine Aussage über den Anteil an Quervernetzung treffen zu können, wurde zunächst das Ausmaß des FRET-Effekts bestimmt. In einem Vorexperiment wurden drei verschiedene Varianten vermessen: Es wurden zwei sequenzgleiche 42 nt lange DNA-Stränge, einer mit Cy5 am 5'-Ende und mit Cy3 am 3'-Ende (**Cy3-42mer-Cy5**, 1) und einer mit Cy5 am 5'-Ende und mit Cy3 am 3'-Ende (**Cy5-42mer-Cy3**, 2), mit einer komplementären DNA (**Komplementäre-DNA**) hybridisiert. Diese Werte sollten 0% Quervernetzung repräsentieren (Abbildung 49). Für 100% Quervernetzungen wurden beide Sequenzen

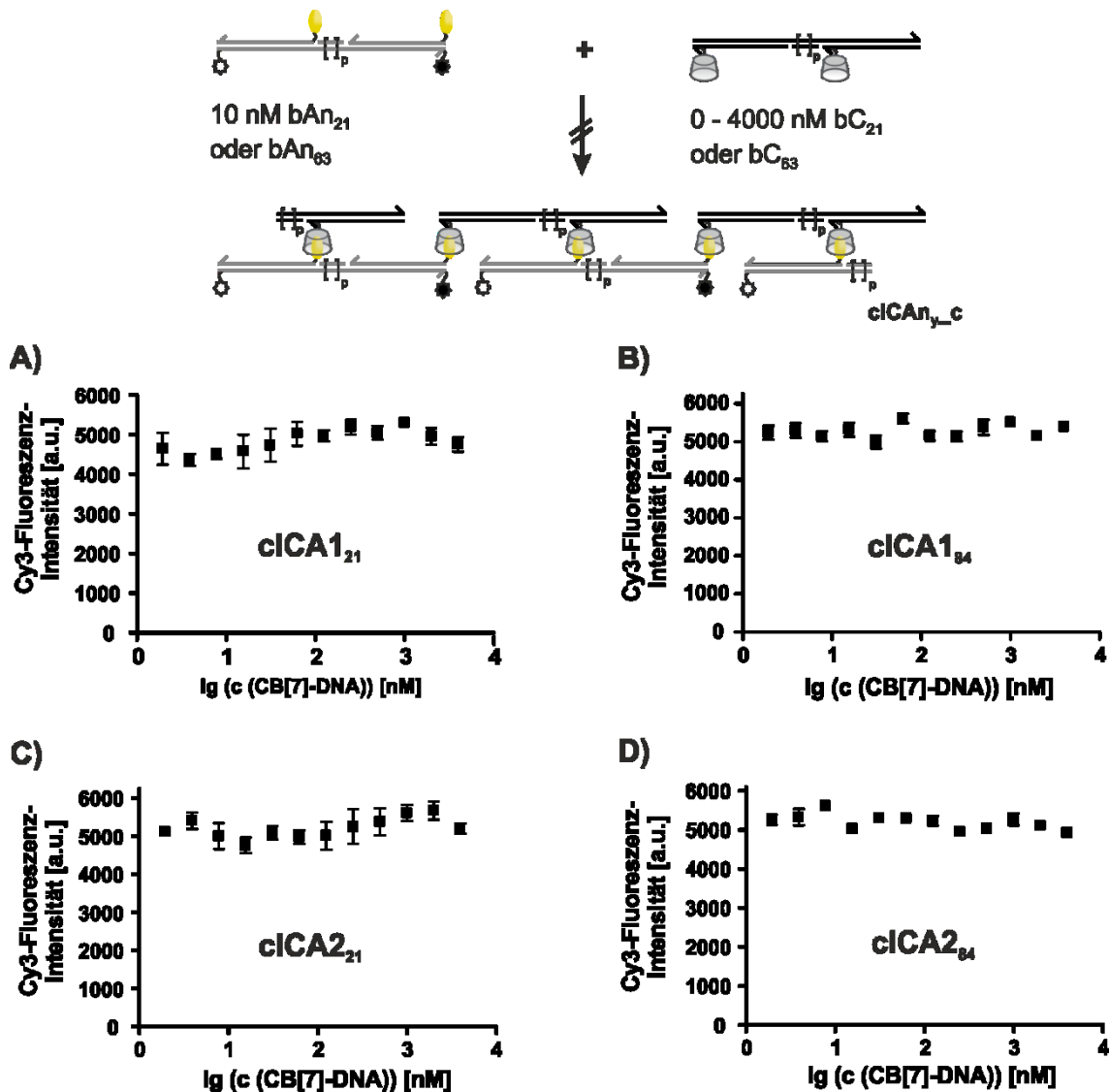


Abbildung 48: Nicht vorhandene Abhängigkeit der Cy3-Fluoreszenzintensität der Komplexe A) $bA1_{21}$, B) $bA1_{63}$, C) $bA2_{21}$ und D) $bA2_{63}$ von der Konzentration der Komplexe A) bC_{21} , B) bC_{63} , C) bC_{21} und D) bC_{63} . Daraus lässt sich schließen, dass die bimolekularen Komplexe A) $bCA1_{21}$, B) $bCA1_{63}$, C) $bCA2_{21}$ und D) $bCA2_{63}$ und nicht die multimolekularen A) $clCA1_{21}$, B) $clCA1_{63}$, C) $clCA2_{21}$ und D) $clCA2_{63}$ vorliegen. Bedingungen: 10 nM der Adamantan-modifizierten DNA und 0-4 μM der CB[7]-modifizierten DNA in Phosphatpuffer: 10 mM NaH_2PO_4 , 5 mM MgCl_2 , pH 7.5.

einmal getrennt voneinander und einmal zusammen in einem 1:1 Verhältnis mit einem verbrückenden Templat hybridisiert (Abbildung 49, **3-5**). Die Messungen wurden bei einer Konzentration von 10 μM mit einem Plattenlesegerät durchgeführt. Dabei wurde die Cy3-Fluoreszenzintensität gemessen. Die Komplexe **1** und **2**, die mit einem komplementären Templat hybridisiert wurden, ergaben ähnliche Werte für die Cy3-Fluoreszenzintensität. Wie zu erwarten war, wurde ein FRET-Effekt für die Komplexe **3-5** beobachtet. Während die Werte für die Cy3-Fluoreszenzintensität für die nicht gemischten Komplexe **4** und **5** auf 9.1% und 10.7% sank, wurde für den gemischten Komplex **3** ein höherer Wert erhalten (34.3%). Offensichtlich stehen hier weniger Cy3-Farbstoffe in unmittelbarer Nachbarschaft der löslichen Cy5-Farbstoffe.

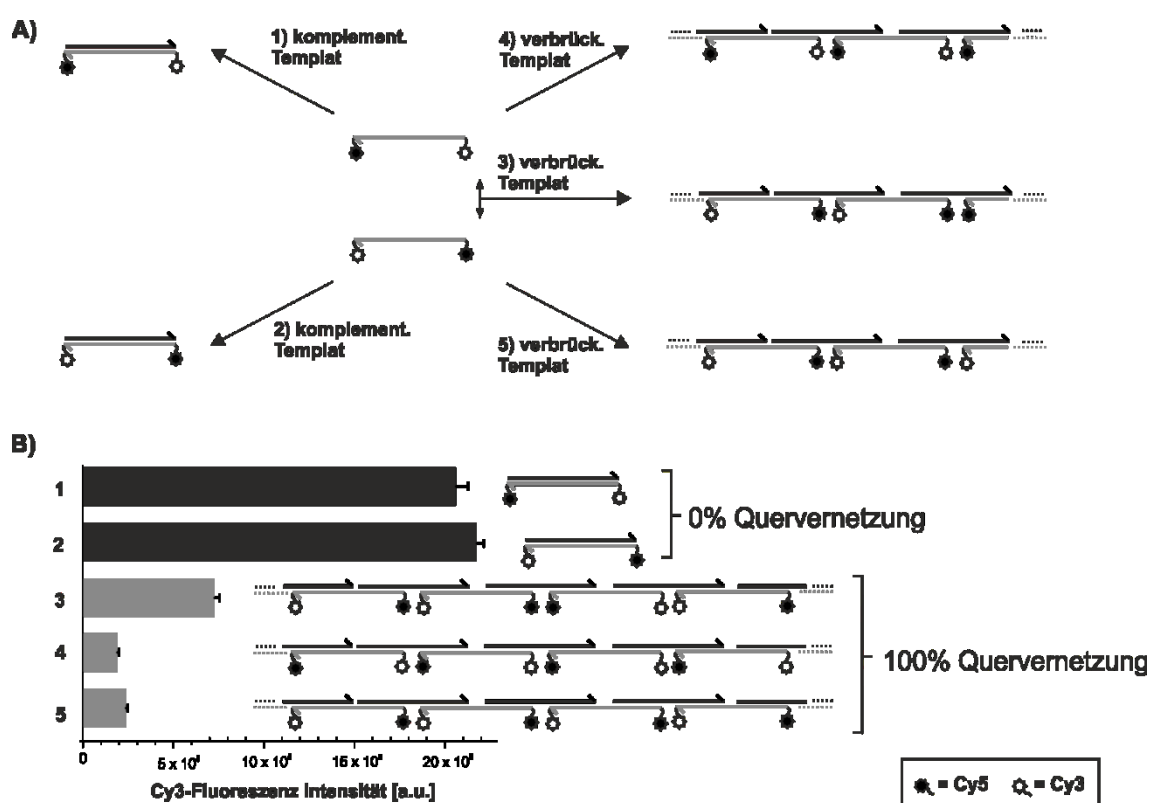


Abbildung 49: Vorexperimente zu quervernetzenden Strukturen. **A)** Zwei gleiche Sequenzen, die entweder am 5'-Ende ein Cy3 und am 3'-Ende ein Cy5 (Cy3-42mer-Cy5) oder am 5' ein Cy5 und am 3' ein Cy3 (Cy5-42mer-Cy3) tragen, können mit einem komplementären Templat hybridisiert werden (**1** und **2**). Diese Stränge können auch entweder getrennt (**4** und **5**) oder zusammen (**3**) mit einem verbrückenden Templat hybridisiert werden. **B)** Cy3-Fluoreszenzintensitätswerte für die DNA-Stränge mit komplementärem Templat (**1** und **2**) oder mit verbrückendem Templat (**3-5**). Die Komplexe **1** und **2** repräsentieren 0% Quervernetzung. Die Komplexe **3-5** repräsentieren 100% Quervernetzung. Bedingungen: 10 μM DNA in einem 1:1-Verhältnis. Pfeilrichtung: 5' \rightarrow 3'.

Abbildung 50 A-D zeigen die Anteile der Quervernetzung für die Binder **Ad1** und **Ad2**. Bei diesen Experimenten wurden die Liganden **bAn_y** und der Rezeptor **bC_y** in einem 1:1 Verhältnis gemischt und die Cy3-Fluoreszenzintensität gemessen. Abbildung 50 A und B zeigen die Werte, wenn eine 100%ige Quervernetzung bei 9.1% Fluoreszenzniedrigung vorliegt und B und D bei 34.3%. Auch bei der letztgenannten Auswertung übersteigt kein Wert die 100%-Marke und es ist generell zu beobachten, dass eine multimolekulare Bindungsweise erst bei sehr hohen Konzentrationen auftritt. Interessanterweise, zeigt Binder Ad1 einen geringeren Anteil an Quervernetzung als der schwächere Binder Ad2. Dies kann daran liegen, dass bei Ad1 eine höherer Bivalenzeffekt vorliegt. Da die multimolekulare Bindungsweise immer in Konkurrenz mit der bimolekularen steht, sollte Quervernetzung eher ausgebildet werden, wenn der bivalente Effekt gering oder gar nicht ausgeprägt ist. Bei dem geringsten Abstand, der untersucht wurde (**clCAn₂₁**), konnte weder bei Binder Ad1, noch bei Binder Ad2 eine signifikante, multimolekulare Bindungsweise be-

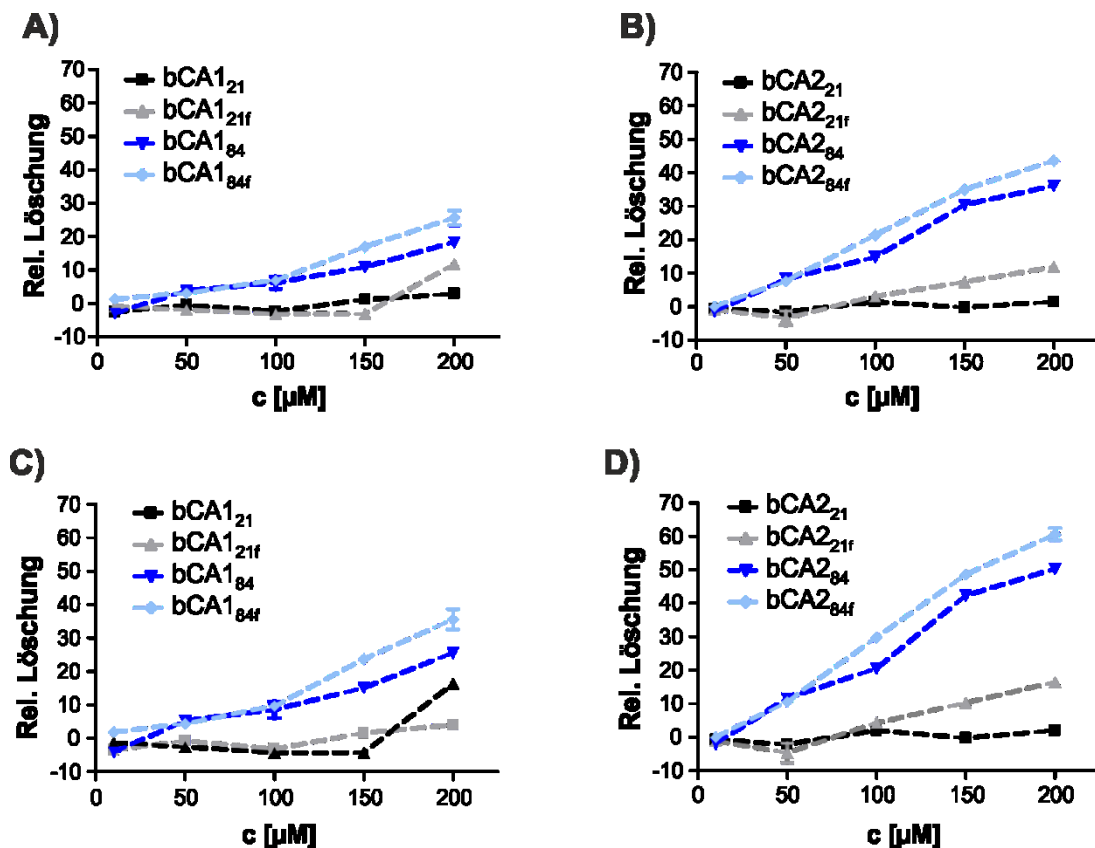


Abbildung 50: Relative Löschung der Cy3-Fluoreszenz für Binder Ad1 (A und C) und Ad2 (B und D). A) und B) 100% der Verbrückung wurden auf 9.1% gesetzt. C) und D) 100% der Verbrückung wurden auf 34.3% gesetzt. Bedingungen: 1:1 von Adn-modifiziertem Komplex und CB[7]-modifizierten Komplex. Konzentrationen: 10 μM , 50 μM , 100 μM , 150 μM und 200 μM in Phosphatpuffer (10 mM NaH_2PO_4 , 5 mM MgCl_2 , pH 7.5).

obachtet werden. Höchstwahrscheinlich ist dies darauf zurückzuführen, dass hier bei beiden Systemen der bivalente Effekt zu stark ist, um eine Verbrückung zuzulassen. Wird die Flexibilität hingegen erhöht (**clCA_{n23f}**), steigt der Anteil der verbrückenden Bindungsweise für hohe Konzentrationen (**clCA1_{23f}**: 200 μ M, **clCA2_{23f}**: 150 μ M). Wird der Abstand der Ligand/Rezeptor-Paare erhöht (**clCA_{n84}**), so steigt der Anteil der multimolekularen Bindungsweise ebenfalls, wobei der Effekt beim schwächeren Binder Ad2 (**clCA2₈₄**) größer ist. Die Erhöhung von Flexibilität (**clCA_{n86f}**) führt zu einer stärkeren Quervernetzung für beide Binder Ad1 und Ad2.

Zusammenfassend tritt Quervernetzung erst bei sehr hohen Konzentrationen auf. Bei niedrigen Konzentrationen ($\leq 10\mu$ M) binden alle hier untersuchten Komplexe bimolekular. Weiterhin ist ein Auftreten multimolekularer Bindungsmodi abhängig davon, wie weit die Rezeptor/Ligand-Paare voneinander entfernt sind. Je größer der Bindungsabstand, desto eher bilden sich multimolekulare Komplexe aus. Eine Erhöhung der Flexibilität verursacht den gleichen Effekt. Daraus folgt, dass multimolekulare Wechselwirkungen begünstigt werden, wenn die bivalente Bindungsverstärkung fehlt.

Generell kann davon ausgegangen werden, dass Quervernetzung nur dann vorliegen kann, wenn hohe Konzentrationen, kein oder nur ein schwacher bivalenter Effekt und schwache monovalente Interaktionen vorhanden sind.

4.3 Zusammenfassung: Grenze der Bivalenz

Im ersten Teil dieser Arbeit sollten die Grenzen der Bivalenz untersucht werden. Es sollte gezeigt werden, wie sich eine bivalente Verstärkung bei der Änderung des Abstands der Bindungseinheiten verhält und wie dies von der Flexibilität des Systems und der Bindungsstärke der einzelnen Rezeptor-Ligand-Module abhängt. Abschließend sollte untersucht werden, unter welchen Bedingungen bivalente Binder in der Lage sind multimolekulare Strukturen auszubilden.

Die Hauptschwierigkeit dieses Projektes stellte die Findung eines passenden Modellsystems dar. Zunächst wurde ein relativ schwaches Bindungspaar basierend auf den Wirt β -Cyclodextrin und den Gast Rhodamin B gewählt. Es stellte sich heraus, dass dieses Modellsystem nicht für die erforderlichen Messungen geeignet war, da die moderaten Bindungskonstanten relativ hohe Konzentrationen für die Bestimmung der Bindungsaffinitäten erforderten. Diese führten zu unerwünschten Wechselwirkungen, die auch durch die Verwendung von höheren Konzentrationen an Magnesium nicht unterbunden werden konnten. Aufgrund dessen wurde das Modellsystem dahingehend geändert, dass mit CB[7] ein anderer Wirt für das System gewählt wurde, der sehr starke Gast-Wirt-Komplexe ausbilden kann. Das Verdrängungsexperiment, bei dem mit Adamantan-modifizierter DNA entweder Rhodamin B oder Pyronin B aus dem CB[7]-Käfig verdrängt wurde, konnte nicht die gewünschten Ergebnisse liefern, da kein bivalenter Effekt beobachtet werden konnte. Die Vermutung, dass Adamantan eine viel stärkere Bindung zu CB[7] aufweist als die beiden Farbstoffe und dies der Grund für den fehlenden Bivalenzeffekt ist, wurde von Susanne Liese aus dem AK Netz rechnerisch bestätigt. Der monovalente Binder verdrängt bereits bei so niedrigen Konzentrationen die Farbstoffe aus dem Käfig, dass kein Unterschied zu dem bivalenten Fall beobachtet werden konnte. Eine Verringerung der verwendeten Konzentrationen könnte hierbei zwar eine Lösung darstellen, allerdings war dies mit dem hier genutzten System nicht möglich, da das Signal/Rausch-Verhältnis unter diesen Bedingungen zu schlecht wäre. Obwohl die Reichweite der Bivalenz mit diesen Systemen nicht bestimmt werden konnte, konnten wichtige Erkenntnisse zu Verdrängungsexperimenten gewonnen werden. Dass die vorgelegten Konzentrationen einen entscheidenden Einfluss auf die bivalente Verstärkung bei Verdrängungsexperimenten ausüben, ist bisher noch nicht beschrieben worden. Die vorgeleg-

ten Konzentrationen sollten deutlich unter dem Wert der Bindungskonstante zwischen dem zu verdrängendem Stoff und dem Binder sein, um bivalenz verstärkte Bindungen verzeichnen zu können.

Da die Verwendung von niedrigeren Konzentrationen hier nicht möglich war, wurden die Bindungsaffinitäten stattdessen durch die Messung von K_D -Werten bestimmt. Es wurden die Bindungskonstanten zwischen zwei verschiedenen Adamantan-modifizierten DNA-Komplexen und einem CB[7]-modifizierten DNA-Komplex gemessen, was eine Untersuchung der bivalenten Reichweite in Abhängigkeit der monovalenten Dissoziationskonstante ermöglichte. Durch die Verwendung eines FRET-Paars (Cy3-Cy5) zur Bestimmung der Bindungsaffinitäten ließ sich ein bivalenter Effekt bei beiden Systemen beobachten, wobei der stärkere Komplex eine höhere bivalente Verstärkung bei gleichen Bindungsabständen aufwies. Dieser zeigte auch bei relativ großen Bindungsabständen noch einen bivalenten Effekt, wobei der schwächere Komplex schon ab einem Abstand von 42 Nukleotiden keine Synergie der beiden Binder mehr zeigte. Somit konnte gezeigt werden, dass der bivalente Effekt eine begrenzte Reichweite besitzt. Je weiter die Binder voneinander entfernt sind, desto geringer ist die bivalente Verstärkung. Diese ist auch abhängig von der Stärke der Bindung. Liegt eine starke monovalente Bindung vor, so kann der bivalente Effekt auch über größere Bindungsabstände wirken. Erhöhte Flexibilität hingegen führte zu einem Absinken des Bivalenzeffekts für beide Systeme und zeigt somit, dass bei optimaler Ausrichtung der Binder, eine höhere Flexibilität kontraproduktiv ist. Die Abnahme der bivalenten Verstärkung in Abhängigkeit des Bindungsabstands wurde von Susanne Liese aus dem AK Netz ebenfalls rechnerisch bestätigt.

Abschließend wurde gezeigt, welcher Bindungsmodus (bimolekular oder multimolekular) bei verschiedenen Bedingungen vorliegt. Entropisch ist die bimolekulare Bindungsweise bevorzugt. In der Natur kommen jedoch Strukturen vor, in denen eine multimolekulare Bindungsweise vorliegen muss, damit quervernetzte Strukturen ausgebildet werden können. Die hier durchgeführten Experimente ergaben, dass bei geringen Konzentrationen ausschließlich bimolekulare Strukturen vorliegen. Wird die Konzentration erhöht, so steigt auch der Anteil an Quervernetzung. Weiterhin spielt hier die Bindungsstärke der monovalenten Komplexe, der Abstand der Binder und die Flexibilität eine Rolle. Je stärker der monovalente Binder, je kleiner der Abstand der Binder und je rigider der Komplex, desto geringer ist der Anteil an Quervernetzung. Generell kann gesagt werden: Je

4.3 Zusammenfassung: Grenze der Bivalenz

geringer der bivalente Effekt eines Systems, desto höher ist der Anteil multimolekularer Bindungen.

4.4 Bispezifische Inhibitoren für VEGFR2 und $\alpha_v\beta_3$ -Integrin

4.4.1 Einleitung und Problemstellung

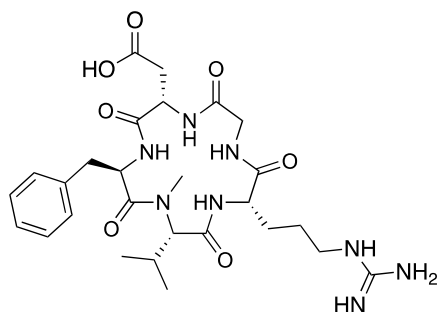


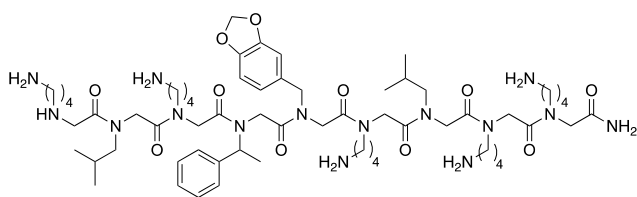
Abbildung 51: Chemische Struktur von Cilengitid.

Der VEGFR2-Rezeptor und der $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Rezeptor werden in vielen humanen Krebszellen, wie zum Beispiel der HUVEC-Zelllinie, überexprimiert. Die Angiogenese wird unter anderem durch die Interaktion dieser Rezeptoren eingeleitet.¹⁵⁵ Eine Inhibition beider Rezeptoren mit nur einem Molekül oder Komplex könnte einerseits durch den Bivalenz-Effekt zu einem sehr starken Binder führen und andererseits auch die Selektivität gegenüber Krebszellen erhöhen,

da der Binder nur an die Zellen hochaffin binden würde, die beide Rezeptoren überexprimieren. In der Literatur sind bereits Binder für beide Rezeptoren beschrieben worden.^{108, 112, 114, 117-119, 129, 135, 142, 144, 147, 150, 156, 182-183} Das Cilengitid, ein cyclisches Pentapeptid (Abbildung 51), bindet stark an $\alpha_v\beta_3$ -Integrin. Dieses wurde bereits in klinischen Studien erprobt und stellt einen sehr guten Antagonisten für $\alpha_v\beta_3$ -Integrin dar, wenn Konzentrationen oberhalb des subnanomolaren Bereichs verwendet werden. Denn im subnanomolaren Bereich ergaben Studien, dass Cilengitid das Tumorwachstum fördern kann.¹⁸⁴ Für VEGFR2 sind ebenfalls Binder bekannt. Vor allem kleine Moleküle, Peptide oder Peptidmimetika stellen potente Inhibitoren dar. Die Arbeitsgruppe von Kodadek stellte ein Peptoid vor, welches den VEGFR2 bindet.^{114, 185} Die kovalente Verbrückung dieses Peptoids durch eine Peptidsequenz zu einem bivalenten Konstrukt führte zu einem deutlich affineren Binder (etwa 90fach stärkere Bindung zu VEGFR2 als der monovalente Binder, Abbildung 53). Weiterhin sollten durch die hohe Affinität viel geringere Konzentrationen für eine Bindung benötigt werden. Dies sollte dazu führen, dass das bispezifische Konstrukt nur an die Zellen bindet, bei denen diese Rezeptoren überexprimiert werden und folglich nur an die Krebszellen und nicht an die gesunden Zellen.

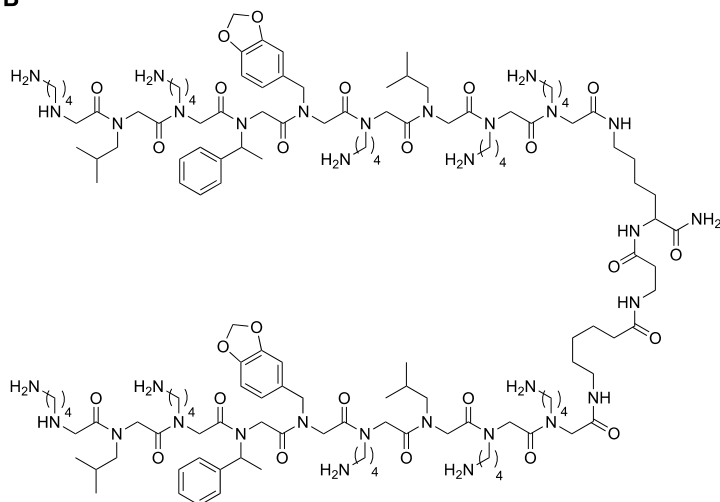
4.4 Bispezifische Inhibitoren für das VEGFR2 und das $\alpha_v\beta_3$ -Integrin

A



monovalentes Peptoid $K_D = 2 \mu\text{M}$

B



bivalentes Peptoid $K_D = 30 \text{ nM}$

Abbildung 53: Chemische Strukturen der Peptide. **A)** Monovalentes Peptoid. **B)** Bivalentes Peptoid.

kann weiterhin mit einem Fluorophor versehen werden, um fluoreszenz-basierte Messungen zu ermöglichen (Abbildung 52). Die Verknüpfung der Liganden an DNA kann durch

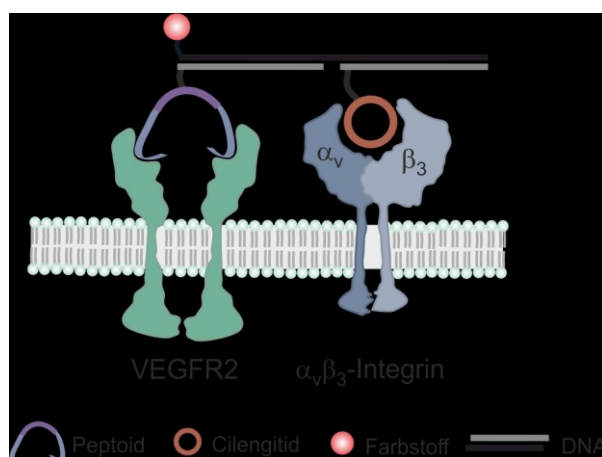


Abbildung 52: Bispezifischer Binder für die beiden Rezeptoren VEGFR2 und $\alpha_v\beta_3$ -Integrin. Ein Peptoid, welches an den VEGFR2-Rezeptor bindet und ein Cilengitid, welches an das $\alpha_v\beta_3$ -Integrin bindet, können durch DNA miteinander verknüpft werden.

Es ist nicht bekannt, in welchen Abständen VEGFR2 und $\alpha_v\beta_3$ -Integrin auf der Zelloberfläche stehen. Aus diesem Grund wurden die Liganden (Cilengitid und Peptoid) an DNA gebunden. Dies bietet die Abstände der Liganden kontrollieren zu können. Um einen bispezifischen Antagonisten mit DNA als Gerüst herzustellen, ist es vorteilhaft, zunächst DNA-Einzelstränge mit den entsprechenden Liganden zu modifizieren, die dann durch die Verwendung eines passenden Templates in einem Komplex präsentiert werden können. Das Template

verschiedene Ligationmethoden erfolgen. In dieser Arbeit wurden bereits mehrere Konjugationsmethoden vorgestellt. In diesem Teil der Arbeit wurde die CuAAC durchgehend verwendet, da Alkin-modifizierte DNA sehr einfach durch die Verwendung eines Alkin-modifizierten Harzes erhalten werden kann. Eine Konjugation der Antagonisten mit der DNA kann durch Azid-modifizierte Liganden ermöglicht werden. Dabei sollte sowohl das Cilengitid (Abbildung 51), als auch

4.4 Bispezifische Inhibitoren für das VEGFR2 und das $\alpha_v\beta_3$ -Integrin

das monovalente und bivalente Peptoid (Abbildung 53) Azid-modifiziert werden und durch eine CuAAC an verschiedene DNA-Einzelstränge angebracht werden. In den folgenden Kapiteln wird die Synthese dieser Konstrukte näher erläutert.

4.4.2 Synthese Cilengitid-modifizierter DNA

Wie bereits oben erwähnt, stellt Cilengitid einen guten Liganden und Antagonisten für $\alpha_v\beta_3$ -Integrin dar und wurde bereits in klinischen Studien erprobt.¹⁴⁷ Eine einfache RGD-Sequenz bindet an viele Integrine und stellt somit keinen selektiven Binder dar.¹³⁴ Die cyclische Anordnung im Cilengitid und die damit einhergehende räumliche Anordnung der Aminosäurereste führen zu einer recht hohen Selektivität für $\alpha_v\beta_3$ -Integrin.¹⁴² Diese kann durch Methylierung des Amins vom Valin weiter verstärkt werden.¹³⁹ Die Seitenkette des Valins wiederum hat keinen nennenswerten Einfluss auf die Bindung.¹³⁵ Somit sollte es möglich sein, Valin durch eine beliebige Aminosäure auszutauschen, ohne die Bindungsaffinität zum $\alpha_v\beta_3$ -Integrin zu verringern. Der Austausch von Valin durch Azidolysin würde die Konjugation mit einer Alkin-modifizierten DNA erlauben. Die Methylierung des Azidolysins sollte am Harz erfolgen,¹⁸⁶ da eine Synthese des Methyl-

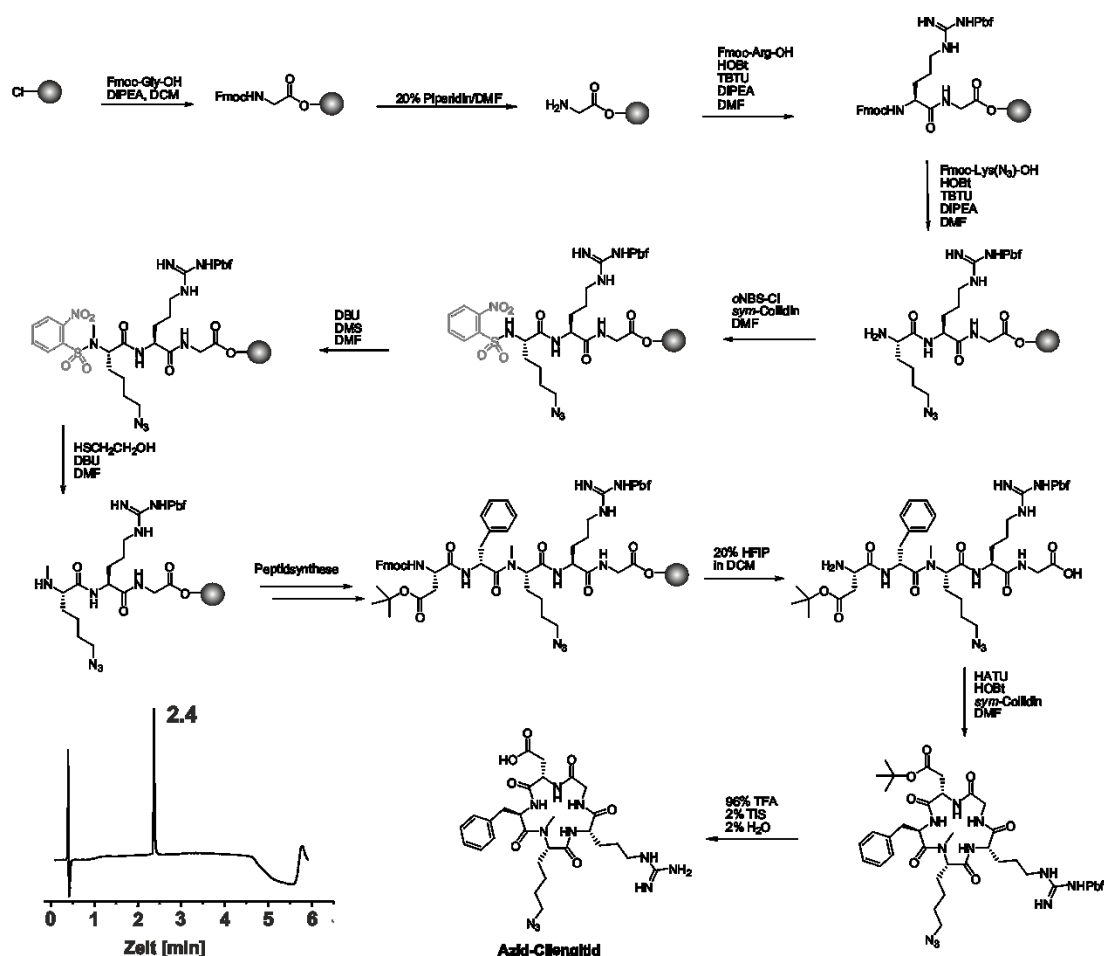


Abbildung 54: Synthese des Azid-modifizierten Cilengitids (**Azid-Cilengitid**).

modifizierten-Fmoc-Lys(N₃)-OH in Lösung mehrere Synthesestufen und Aufreinigungsschritte erfordert und zeitaufwendig wäre.] Für die Synthese wurde ein Chlortritylharz verwendet, da nach der Abspaltung des Peptids die Cyclisierung erfolgen sollte.¹⁴² Die Synthese des Cilengitids ist in Abbildung 54 dargestellt. Zuerst wurde das Harz mit Glycin in trockenem DCM beladen. Nach der Fmoc-Abspaltung erfolgte die Kupplung der Aminosäuren Fmoc-Arg(Pbf)-OH und Fmoc-Lys(N₃)-OH. Die Fmoc-Schutzgruppe des Azidolysins wurde anschließend abgespalten und das freie Amin mit NBS geschützt. Anschließend konnte die Methylierung mit DBU als Base durch Reaktion mit Dimethylsulfat durchgeführt werden. Das NBS wurde abgespalten und auf das methylierte Azidolysin konnten nun die letzten Aminosäuren (Fmoc-Phe-OH und Fmoc-Asp-OH) gekuppelt werden.¹⁸⁶ Die Methylierung und anschließende Kupplung verlief nicht quantitativ, sondern mit Ausbeuten von nur ca. 50%. Da allerdings nicht viel an Endprodukt für die Kupplung an DNA gebraucht wurde, wurde auf eine Optimierung dieser Reaktion, durch beispielsweise mehrfache Methylierung verzichtet. Die Kupplung an das Fmoc-Phe-OH wurde doppelt (2 x 3.5 Stunden) durchgeführt. Um den Umsatz zu verbessern, könnte auch hier die Kupplung länger oder öfter durchgeführt werden. Anschließend erfolgte die Abspaltung vom Harz mit HFIP (20% in DCM). Die Schutzgruppen der Seitenketten der Aminosäuren werden bei diesen Bedingungen nicht abgespalten und ermöglichen anschließend eine selektive Cyclisierung in Lösung. Nach dem Abspalten wurde das lineare Peptid entgegen der Literatur¹⁸⁶ zunächst mittels HPLC aufgereinigt, um die bereits entstandenen Nebenprodukte abzutrennen. Die Cyclisierung wurde mit HATU, HOBt und *sym*-Collidin als Base in hoher Verdünnung (0.1 mM) in DMF durchgeführt. Der Reaktionsfortschritt wurde dabei mittels UPLC verfolgt. Nach 20 h waren etwa 50% des Eduktes cyclisiert. Daraufhin wurde noch ein weiteres Äquivalent Kupplungsreagenz zur Lösung hinzugegeben und weitere 16 h lang gerührt. Somit konnte die Ausbeute auf 70% gesteigert werden. Anschließend wurde das DMF unter vermindertem Druck entfernt und die Schutzgruppen mit TFA abgespalten. Die Aufreinigung mit HPLC lieferte das Produkt in genügender Ausbeute.

Alkin-modifizierte DNA wurde durch die Verwendung eines Alkin-modifizierten Harzes in der automatisierten DNA-Festphasensynthese¹⁷³ erhalten. Das azid-modifizierte Cilengitid konnte nun an eine alkin-modifizierte DNA (**Alkin-DNA**) mit Kupfersulfat, THPTA

und Natriumascorbat in PUS-Puffer konjugiert werden (Abbildung 55). Dies lieferte das Zielprodukt in guter Ausbeute (47%).

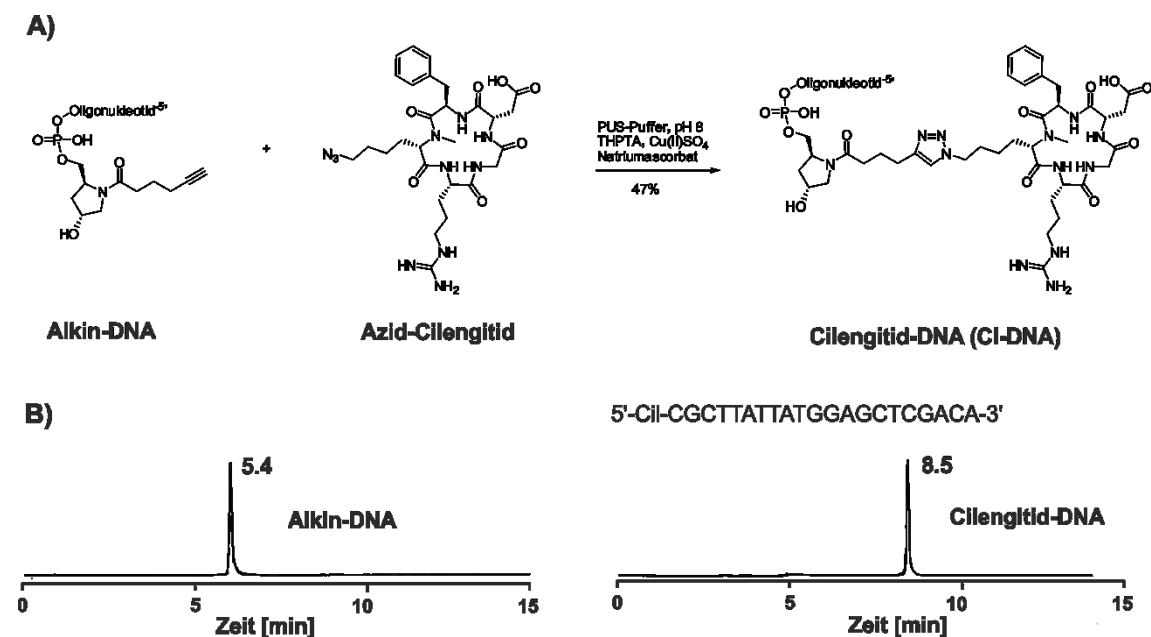


Abbildung 55: A) Konjugation einer alkin-modifizierten DNA mit einem Azid-modifizierten Cilengitid. Bedingungen: 200 nmol Alkin-DNA, 1 μmol Azid-Cilengitid, PUS-Puffer (100 mM Tris, 100 mM NaOAc, 1 mM MgCl_2 , pH 8), 11 μmol THPTA, 20 μmol Natriumascorbat, 2.25 mM Cu(II)Sulfat, 3 h, 55 °C. Ausbeute: 50%. **B)** HPLC-Chromatogramm der Alkin-DNA und der Cilengitid-DNA (CI-DNA).

4.4.3 Synthese der Peptoid-modifizierten DNA

Das DNA-basierte Modellsystem, welches für dieses Projekt benutzt werden soll, bietet nun zwei Möglichkeiten, um die von Kodadek et al. gefundenen Peptoide zu präsentieren. Die monovalente Peptoidsequenz (**GU40C**) könnte analog zum Cilengitid mit einem Azid modifiziert und anschließend an zwei unterschiedliche DNA-Sequenzen konjugiert werden (Abbildung 56). Die Hybridisierung mit einem entsprechenden Templat würde eine bivalente Darstellung des monovalenten Peptoids (**bP1**) ergeben. Die bindende Sequenz wird auch durch das bivalente Peptoid (**bP2**) dargestellt. Dieses kann auch kovalent an eine DNA gebunden werden, wenn das bivalente Peptoid mit einem Azid modifiziert wird (Abbildung 56). Der Unterschied dieser beiden Systeme liegt in der Flexibilität des verbindenden Gerüsts. Im ersten Modell (**bP1**) kann das System entweder rigide dargestellt werden, indem keine ungepaarten Nukleotide eingebaut werden oder auch flexibler, indem längere Template benutzt werden, die ungepaarte Nukleotide im Komplex erlauben. Das zweite Modell (**bP2**), in dem die bindende Peptoidsequenz durch eine Peptidsequenz dimerisiert ist, beinhaltet hingegen eine recht hohe Flexibilität. Weiterhin sind die bindenden Peptoidsequenzen hierbei in einem anderen Abstand zueinander arrangiert als im ersten Modell **bP1**. Das bivalente Peptoid (**GU40C4**) wurde bereits in der Literatur beschrieben und hat eine hohe Affinität für VEGFR2 im Vergleich zur monovalenten Sequenz.¹¹⁴ In dieser Arbeit sollten beide Systeme untersucht werden. Die Anbringung an

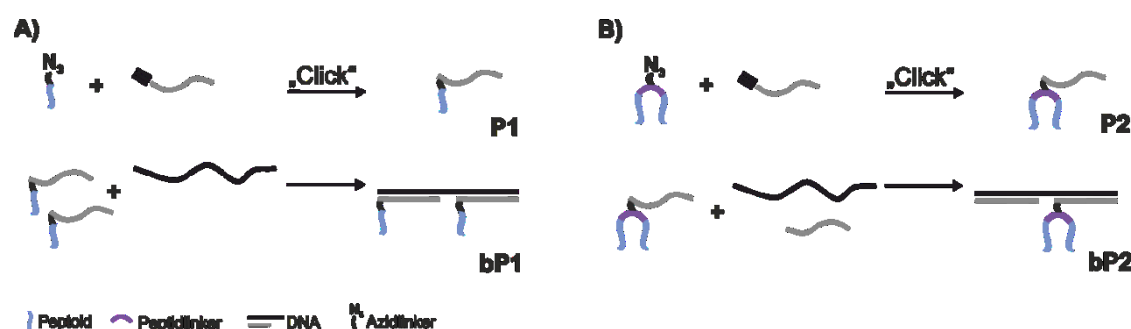


Abbildung 56: Strategien zur bivalenten Präsentation einer VEGFR2-bindenden Peptoidsequenz. **A)** Die monovalente Peptoidsequenz wird zunächst mit einem Azid-modifiziert und anschließend an eine mit einem Alkin modifizierte DNA durch CuAAC kovalent angebunden. Zwei unterschiedliche monovalente Peptoid-DNA-Konjugate (**P1**) können bivalent dargestellt werden, indem ein komplementäres Templat hinzugegeben wird. **B)** Das Peptoid wird bivalent dargestellt, indem eine flexible Peptidsequenz die beiden Teile verbrückt. Durch eine Azidmodifikation kann dieses kovalent an eine Alkin-modifizierte DNA gebunden werden (**P2**). Durch die Zugabe eines passenden Templates und einem DNA-Strang, welcher zum DNA-Überhang komplementär ist, wird der Komplex **bP2** erhalten.

DNA erlaubt hierbei eine präzise Einstellung der Flexibilität.

4.4.3.1 Synthese der Peptoid1-DNA-Konjugate (P1-DNA)

Die Synthese des monovalenten Peptoids **P1** erfolgte am Rink-Amid-Tentagel-Harz (Abbildung 57). Zunächst wurde Bromessigsäure und anschließend das 1-Azido-Propanamin gekuppelt, welches die Konjugation an Alkin-modifizierte DNA ermöglichen sollte. Anschließend wurde, wie bereits in der Literatur beschrieben,¹⁸⁷ die restliche Sequenz aufgebaut. Das Volllängenpeptoid wurde vom Harz abgespalten und anschließend

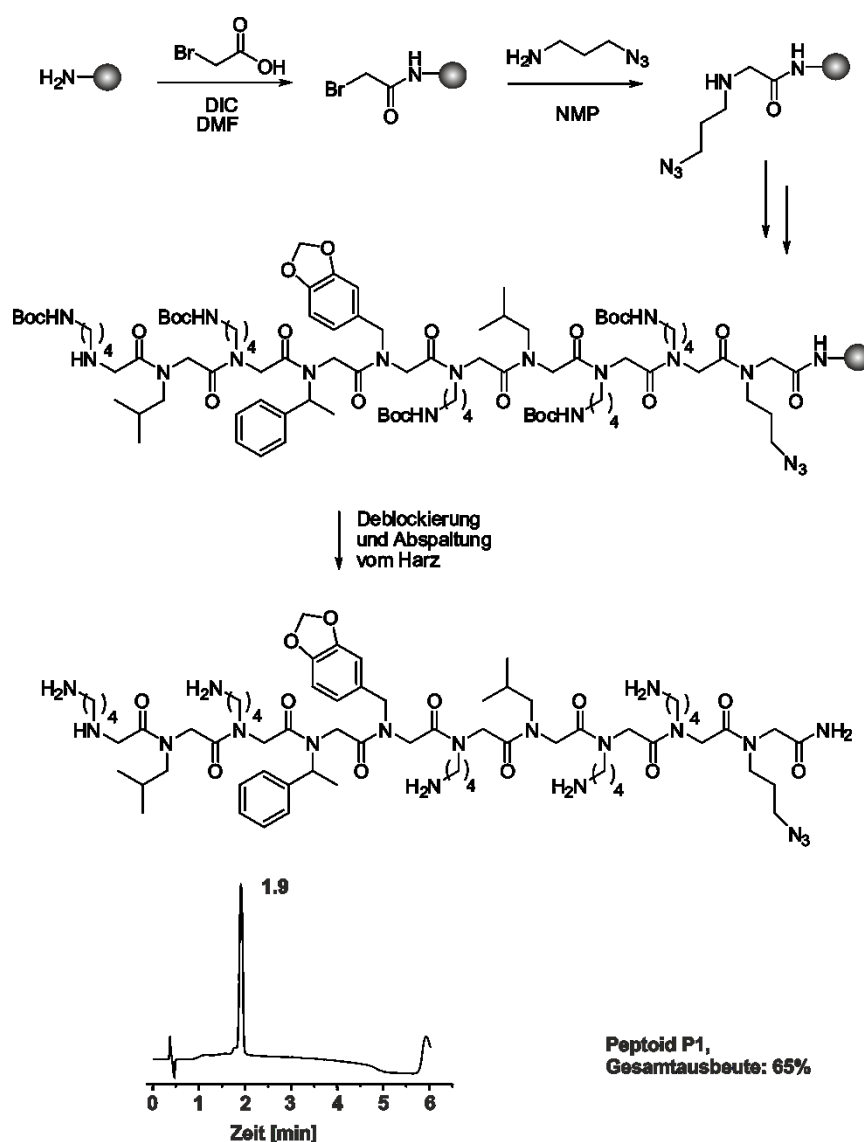


Abbildung 57: Synthese des Peptoids **P1** an fester Phase.

mittels HPLC gereinigt. Die Synthese erfolgte in sehr guter Ausbeute (65%). Alkin-modifizierte DNA wurde durch die Verwendung eines Alkin-modifizierten Harzes in der automatisierten DNA-Festphasensynthese¹⁷³ erhalten. Anschließend wurde das Peptoid mittels CuAAC mit THPTA, Kupfersulfat und Natriumascorbat an Alkin-modifizierte DNA mit guter Ausbeute (31%-

33%) gekuppelt (Abbildung 58).

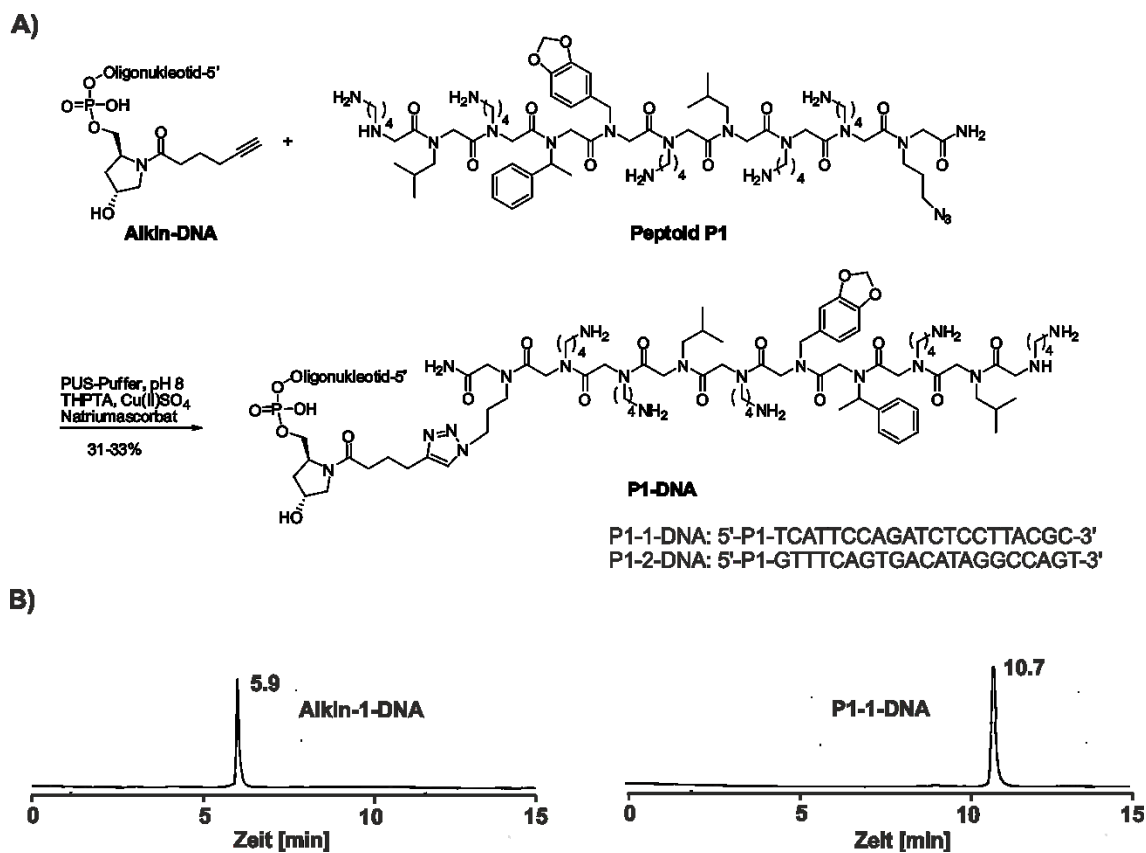


Abbildung 58: **A)** Synthese der Peptoid1-modifizierten DNA (P1-DNA). Bedingungen: 200 nmol Alkin-DNA, 1 μ mol Azid-Pepoid **P1**, PUS-Puffer (100 mM Tris, 100 mM NaOAc, 1 mM MgCl₂, pH 8), 11 μ mol THPTA, 20 μ mol Natriumascorbat, 2.25 mM Cu(II)Sulfat, 3 h, 55 °C. Ausbeute: 50%. **B)** Analytisches HPLC-Chromatogramm und MALDI-TOF-Spektrum von **P1-1-DNA**.

4.4.3.2 Synthese der Peptoid2-DNA-Konjugate (P2-DNA)

Die Synthese des bivalenten Peptoids **P2** erfolgte ebenfalls, wie auch bei der Synthese von **P1**, am Rink-Amid-Tentagel-Harz (Abbildung 59). Als Erstes wurde das Fmoc-Lys(N₃)-OH gekuppelt. Um ein bivalentes Peptoid aufzubauen, wurde anschließend Fmoc-Lys(Mtt)-OH gekuppelt. Das Amin der Seitengruppe blieb während der nächsten Schritte geschützt, um den erforderlichen Linker, der die beiden potenten Sequenzen miteinander verknüpft, aufzubauen. Es folgten die Kupplungen von Fmoc- β -Ala-OH und Fmoc-Ahx-OH. Danach wurden nacheinander die Mtt-Gruppe des Lysins und die Fmoc-Gruppe der Hexansäure entfernt. Die Entfernung der Mtt-Gruppe musste mehrfach

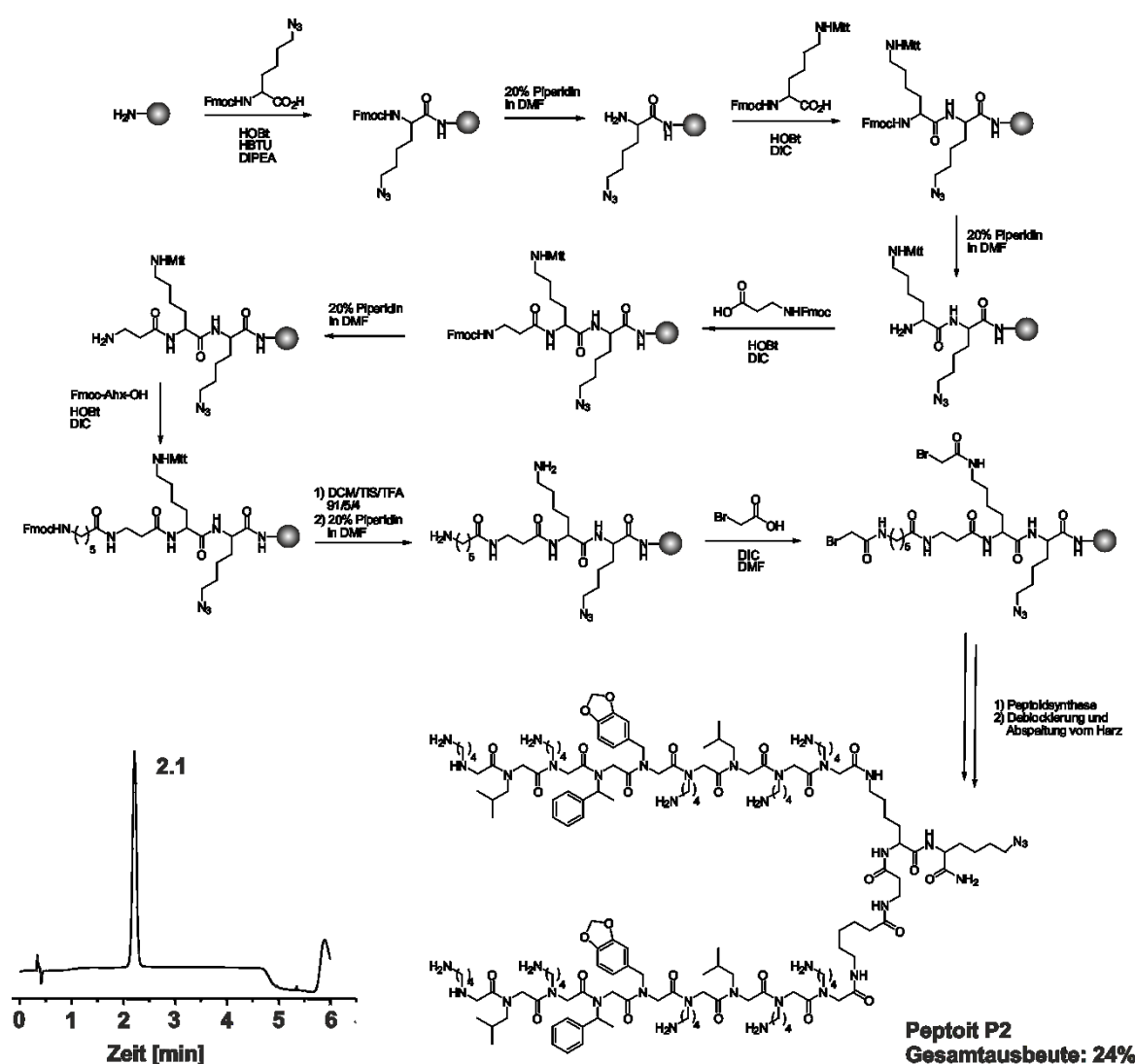


Abbildung 59: Synthese des Peptoid P2 an fester Phase.

durchgeführt werden, um eine vollständige Deblockierung des Amins zu erreichen. Nach 6-maliger Wiederholung der Deblockierung mit DCM/TIS/TFA (91/5/4) konnte die Peptoid-Sequenz an beiden Enden parallel aufgebaut werden. Anschließend erfolgte die Abspaltung vom Harz und die Aufreinigung mittels HPLC. Dies lieferte das Peptoid in guter Ausbeute (24%). Alkin-modifizierte DNA wurde durch die Verwendung eines Alkin-modifizierten Harzes in der automatisierten DNA-Festphasensynthese¹⁷³ erhalten. Die

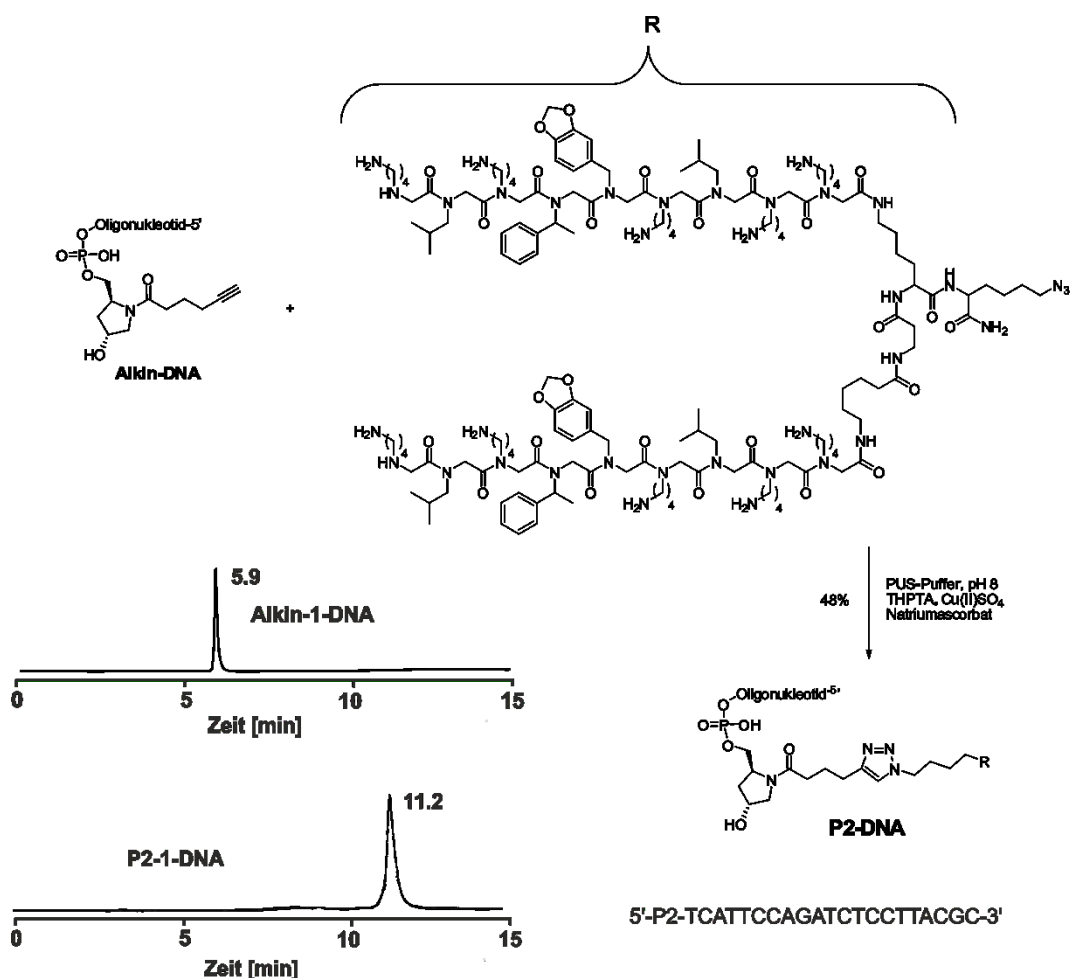


Abbildung 60: Synthese der Peptoid2-modifizierten DNA (P2-DNA). Bedingungen: 200 nmol Alkin-DNA, 1 μ mol Azid-Peptoid **P2**, PUS-Puffer (100 mM Tris, 100 mM NaOAc, 1 mM MgCl₂, pH 8), 11 μ mol THPTA, 20 μ mol Natriumascorbat, 2.25 mM Cu(II)Sulfat, 3 h, 55 °C. Ausbeute: 48%.

Kupplung an die Alkin-modifizierte DNA erfolgte wie auch bei dem monovalenten Peptoid unter gleichen Bedingungen in guter Ausbeute (48%, Abbildung 60).

4.4.4 Bindung von Peptoid-Cilengitid-DNA-Konjugaten an HUVEC Zellen

Zunächst sollte die Bindung des bispezifischen Komplexes an den VEGFR2- und den $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Rezeptor mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht werden. Dazu sollte ein Fluorophor-markiertes Templat verwendet werden. Als Fluorophor wurde Atto 565 gewählt, da dieser eine hohe Helligkeit aufweist. Dies erleichtert die Detektion bei niedrigen Konzentrationen.

Zunächst sollte jedoch bestimmt werden, welche der beiden Anordnungen des Peptoids zu einer stärkeren Bindung führt. Dazu wurden entweder zwei 21 nt monovalente Peptoid 1-DNA-Konjugate durch ein komplementäres 43 nt langes Templat zu einem bivalenten Komplex **bP1** verbrückt (bivalentes P1-System), oder ein bivalentes Peptoid 2-DNA-Konjugat mit einem unmodifizierten DNA-Strang und einem komplementärem Templat hybridisiert **bP2** (bivalentes P2-System). Weiterhin wurde auch ein monovalentes P1-System (**mP1**) konstruiert, indem nur ein monovalentes Peptoid 1-DNA-Konjugat mit einem unmodifizierten DNA-Strang und dem 43 nt langen Templat hybridisiert wurde (Abbildung 61 A). Die bispezifischen Binder wurden auf eine ähnliche Weise gebildet (Abbildung 61 B). Dazu wurde ein 65 nt langes Atto 565-Templat benutzt und mit entweder zwei P1-DNA-Konjugaten und mit dem Cilengitid-DNA-Konjugat (**bP1C**) oder ein P2-DNA-Konjugat mit einem Cilengitid-DNA-Konjugat und einem unmodifizierten DNA-Strang (**bP2C**) hybridisiert. Auch die Bindung von dem Cilengitid-DNA-Komplex **C** sollte gemessen und mit den anderen Bindern verglichen werden. Dieser Komplex

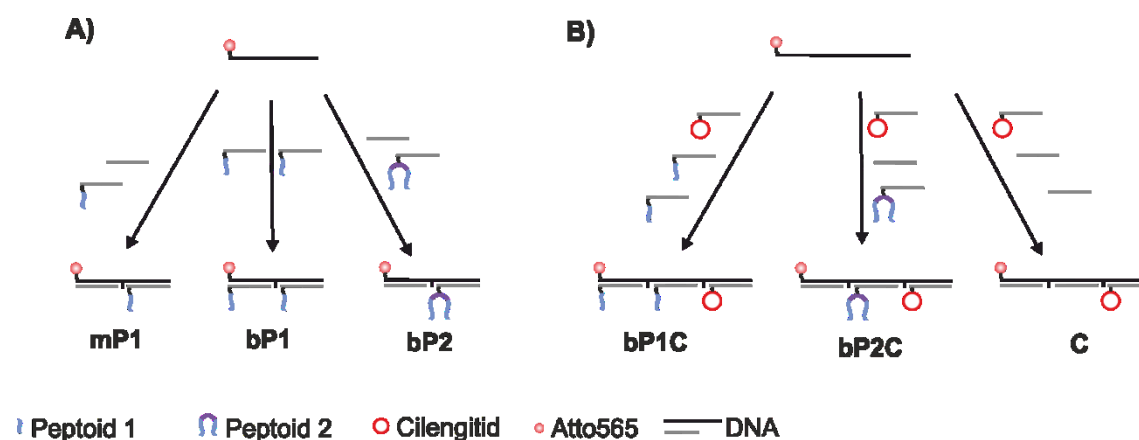


Abbildung 61: Präsentation von monospezifischen und bispezifischen Liganden. **A)** Präsentation von den Peptoiden P1 und P2 zu den Komplexen **mP1**, **bP1** und **bP2**. **B)** Präsentation von den Peptoiden und dem Cilengitid-DNA-Konjugat zu den Komplexen **bP1C**, **bP2C** und **C**.

wurde aus einem 65 nt langem Atto565-Templat, zwei unmodifizierten Templaten und einem Cilengitid-DNA-Konjugat erhalten. Alle Atto-565-markierten Template wurden hierbei so gewählt, dass zwischen den 21 nt langen modifizierten Strängen jeweils ein ungepaartes Nukleotid vorhanden war, um eine gewisse, möglicherweise auch notwendige, Flexibilität für die Bindung zu gewährleisten.

Für die Messungen der mono- und bispezifischen Binder wurde eine Zelllinie benötigt, die beide Rezeptoren überexprimiert. Es wurde sich für die HUVEC-Zelllinie entschieden (VEGFR2: 178.6 TPM, α_v : 72.6 TPM und β_3 : 40.2 TPM), (TPM: *transcriptions per million*),¹⁸⁸ da diese bereits häufig in der Literatur für die Untersuchungen an den beiden Rezeptoren verwendet wurde.^{114, 122, 125, 133} Die Peptoide würden an das VEGFR2 und das

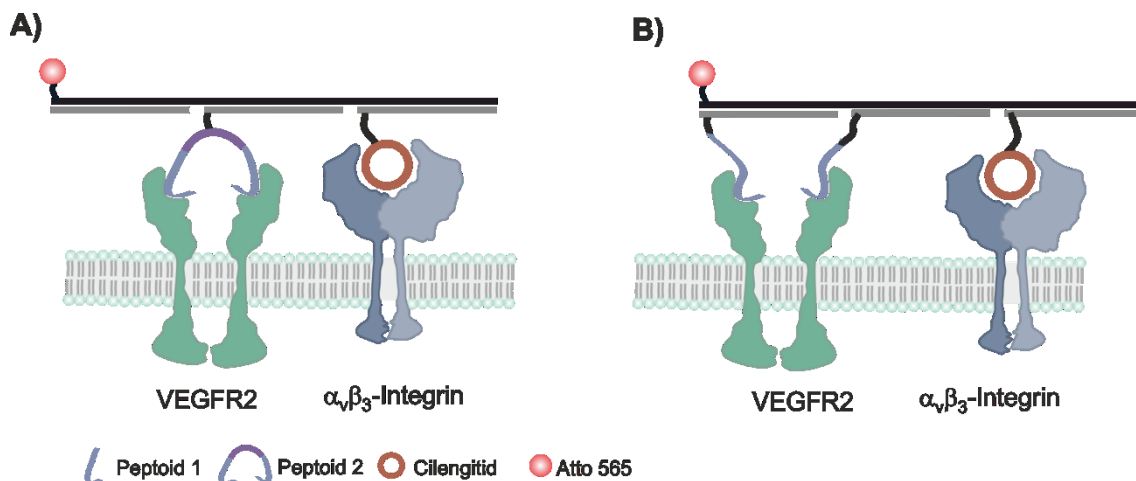


Abbildung 62: Bindung des bispezifischen Konstrukts an VEGFR2 und $\alpha_v\beta_3$ -Integrin. **A)** Das bivalente Peptoid 2 P2 und das Cilengitid C, welche an DNA gebunden sind, werden durch ein passendes DNA-Templat zu einem Konstrukt zusammengeführt, welches an beide Rezeptoren binden kann. **B)** Zwei monovalente Peptoide P1 und das Cilengitid C, welche an DNA angebracht werden sind, können durch ein passendes DNA Templat zu einem bispezifischen Konstrukt zusammengeführt werden, welches an beide Rezeptoren binden kann.

Cilengitid an das $\alpha_v\beta_3$ -Integrin binden (Abbildung 62).

Die Messungen können an einem Fluoreszenzmikroskop durchgeführt werden. Dafür wurden die HUVEC-Zellen in Ibidi-Wellplatten ausplattiert und vor den Messungen ausgehungert (1% FCS). Die Bindungsmessungen sollten in Anwesenheit von VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) stattfinden. Dieser bindet und dimerisiert den VEGFR2-Rezeptor.¹⁸⁹ Es wurden zunächst zwei Möglichkeiten der VEGF-Zugabe getestet. Zum einen wurde das VEGF (1.3 nM) 30 min vor der Komplexzugabe auf die Zellen gegeben und zum anderen wurde das VEGF (1.3 nM) direkt mit dem Komplex auf die

Zellen gegeben. Es wurden weiterhin verschiedene Inkubationszeiten und Konzentrationen (bis zu 10 μM) getestet. Die Ergebnisse zeigten, dass die Messungen bei der gleichzeitigen Zugabe von VEGF und Komplex hellere Fluoreszenzsignale erzeugten. Weiterhin können die Messungen bei dieser Variante deutlich schneller durchgeführt werden. Dies ist für diese Experimente nicht unerheblich, da durch das Aushungern der Zellen (1% FCS, 16-18 h) in einem Zeitintervall von nur 2 h gemessen werden kann. Die Messungen, die nach den 18 h aushungern erfolgten, führten zu weniger starken Fluoreszenzsignalen. Weiterhin wurde eine vermehrte Ablösung der Zellen von der Ibidi-Oberfläche beobachtet. Die besten Ergebnisse wurden erhalten, wenn eine kurze Inkubation des Antagonisten mit den Zellen von ca. 5 min durchgeführt wurde. Längere Inkubationszeiten führten zu keiner Erhöhung des Fluoreszenzsignals. Somit sollten die Zellen idealerweise 16-18 h bei 1% FCS ausgehungert werden und in diesem Zeitintervall die Messungen durchgeführt werden. Dafür sollte sowohl der Antagonist als auch das VEGF zeitgleich hinzugegeben und eine kurze Inkubationszeit von 5 min eingehalten werden. Weiterhin zeigten die orientierenden Untersuchungen, dass Konzentrationen von 250 nM des Antagonisten ausreichten.

Abbildung 63 zeigt die Fluoreszenzbilder, die erhalten wurden, wenn die Komplexe mit 250 nM bzw. 100 nM Konzentration eingesetzt wurden. Zunächst wurde beobachtet, dass das Signal bei 250 nM intensiver war, als bei 100 nM. Es konnte kein deutlicher Unterschied zwischen den monospezifischen Bindern (**bP1**, **bP2** und **C**) und zwischen den bispezifischen Bindern (**bP1C** und **bP2C**) festgestellt werden. Allerdings war ein Unterschied in der Signalintensität zwischen den bispezifischen (**bP1C** und **bP2C**) und monospezifischen Bindern (**bP1**, **bP2** und **C**) zu beobachten. **bP1**, **bP2** und **C** schienen schlechter zu binden als **bP1C** und **bP2C**. Der monovalente Komplex **mP1** erzeugt das schwächste Signal. Die Ergebnisse zeigten zwar, dass die bispezifischen Binder besser binden, allerdings konnte kein Unterschied zwischen den verschiedenen bivalenten Systemen **bP1** und **bP2** ausgemacht werden. Die Bilder gaben ein recht schwaches Signal und lagen nah am Signal des Hintergrunds. Es zeigte sich, dass die Konjugate auch an die Ibidi-Wellplatte binden. Aus diesem Grund wurde eine „Blocklösung“ verwendet, die Lachs-Sperma-DNA und BSA enthielt. Die Sperma-DNA, die kurze DNA-Sequenzen beinhaltet, und das BSA blockieren die möglichen Interaktionsstellen auf der Ibidi-Wellplatte, sodass eine Bindung der Konjugate an diese Stellen minimiert und somit das

4.4 Bispezifische Inhibitoren für das VEGFR2 und das $\alpha_v\beta_3$ -Integrin

Signal/Rausch-Verhältnis verbessert wird. In Abbildung 64 sind die Fluoreszenzmikroskopiebilder gezeigt, bei denen die Blocklösung verwendet wurde.

4.4 Bispezifische Inhibitoren für das VEGFR2 und das $\alpha_v\beta_3$ -Integrin

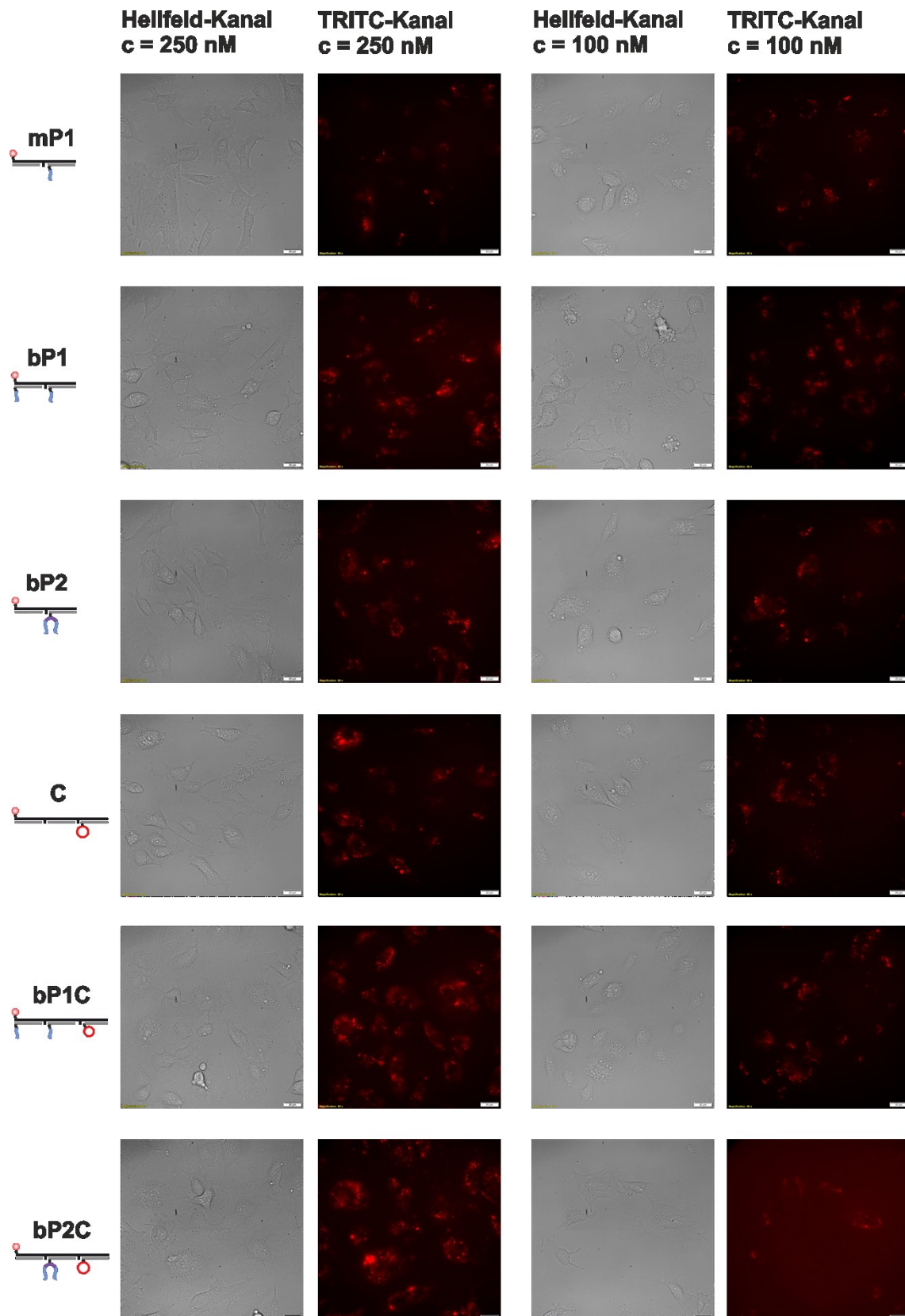


Abbildung 63: Fluoreszenzmikroskopiebilder von HUVEC-Zellen im TRITC-Kanal bei 250 nM (oben) und 100 nM (unten). Bedingungen: 5 min Inkubation in HANKS zusammen mit VEGF (1.3 nM). 5 s Expositionszeit, Graustufenbereich: 2200-18000.

4.4 Bispezifische Inhibitoren für das VEGFR2 und das $\alpha_v\beta_3$ -Integrin

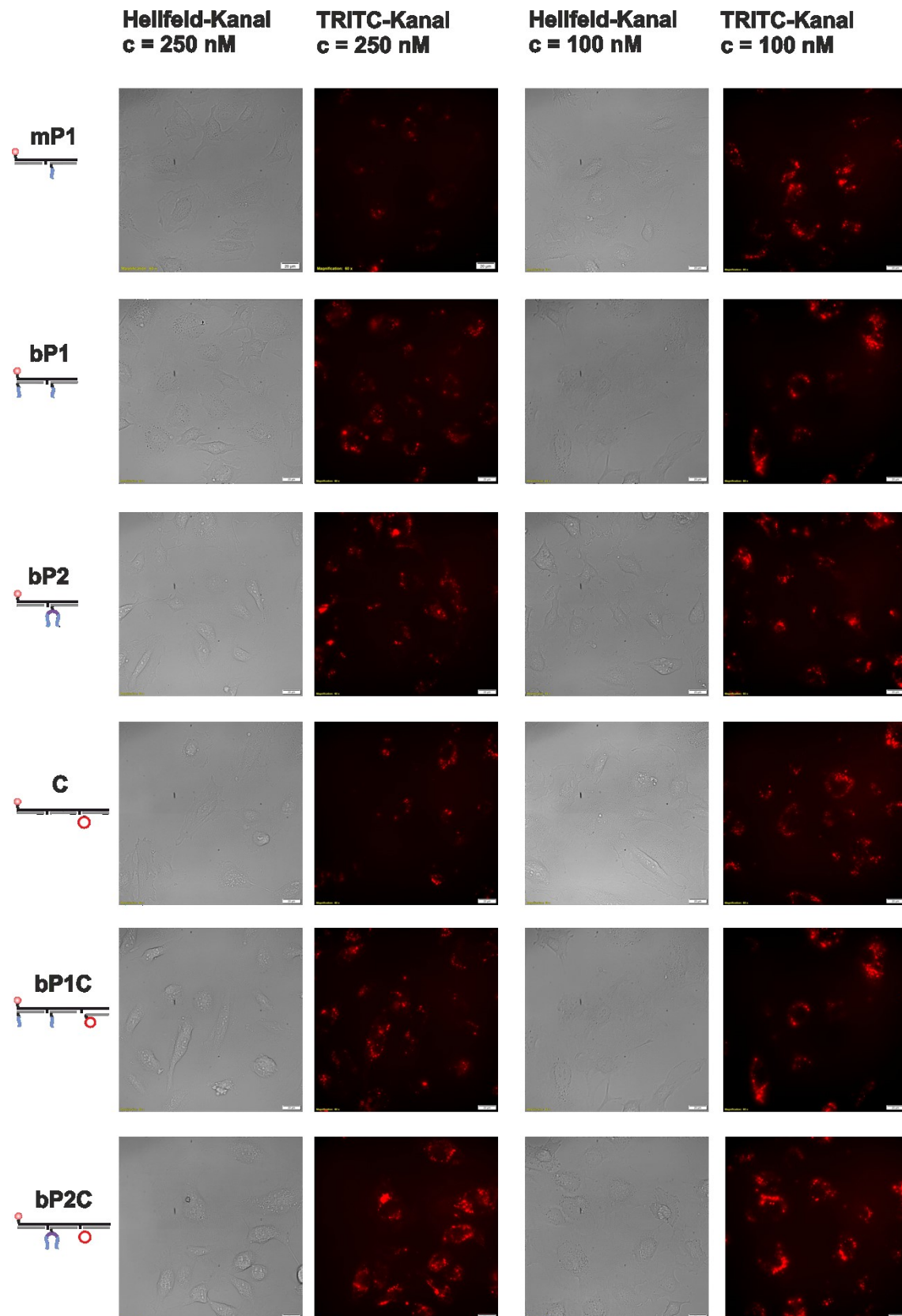


Abbildung 64: Fluoreszenzmikroskopiebilder von HUVEC-Zellen im TRITC-Kanal bei 250 nM (oben) und 100 nM (unten). Bedingungen: 5 min Inkubation in HANKS zusammen mit VEGF (1.3 nM). 5 s Expositionszeit, Graustufenbereich: 2200-15000. 0.1 mg/mL Sperm-DNA, 0.2% BSA, 7 min vor Zugabe der Komplexe.

Alle Bilder ergaben nun ein besseres Signal/Rausch-Verhältnis. Es zeigte sich der gleiche Trend wie auch bei den Messungen ohne Blocklösung. Die bispezifischen Binder ergeben ein helleres Signal als die monospezifischen und der monovalente Binder **mP1** erzeugte das niedrigste Signal. Außerdem lässt sich ein Unterschied der Binder **bP1C** und **bP2C** erkennen. Der zweite Komplex **bP2C** scheint deutlich hellere Signale zu erzeugen. Um diesen Eindruck quantitativ auszudrücken, wurden die Zellen ausgezählt. Bei den Experimenten wurden 5-7 Bilder pro Well aufgenommen, was einer Zellzahl von 50-70 Zellen entspricht. Diese Zellen wurden mit der Software IMAGEJ ausgewertet.

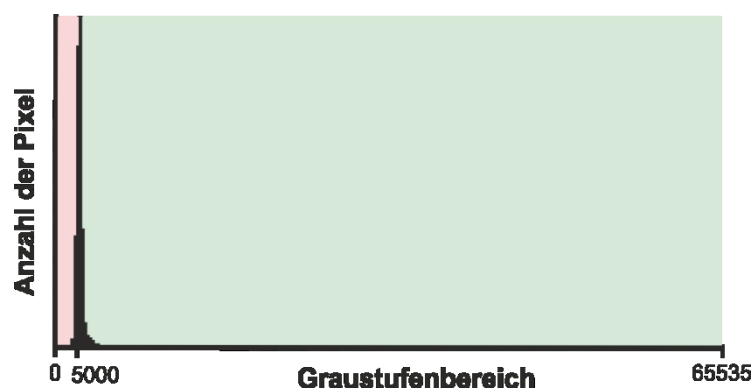


Abbildung 65: Histogramm einer HUVEC-Zelle. Für die Auswertung wurde ein Grenzwert gesetzt (5000). Anschließend wurden die Pixel aufaddiert, die diesen Grenzwert überschreiten (grüner Bereich). Die Pixel, die unter diesem Bereich liegen (roter Bereich), wurden nicht berücksichtigt.

Dabei wurde jede einzelne Zelle umrandet und ein Grenzwert von 5000 gesetzt (Abbildung 65). Anschließend wurde der Anteil an Pixel berechnet, der diesen Wert

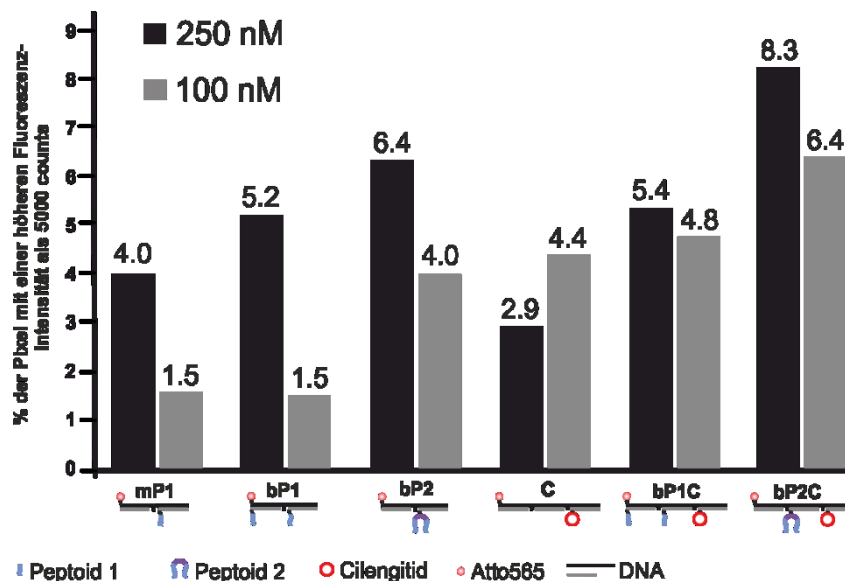


Abbildung 66: Anteil in % der Pixel, die einen höheren Wert als 5000 counts haben. Ausgezählt wurden 50-70 Zellen von 5-7 Bildern.

überschreitet (Abbildung 66). Der monovalente Binder **mP1** zeigt einen etwas geringeren Wert als die Werte der bivalenten Binder **bP1** und **bP2** auf. Bei beiden Konzentrationen (100 nM und 250 nM) lieferte die Anfärbung mit **bP2** höhere Werte als **bP1**, sowohl im mono-, als auch im bispezifischen Fall. Der Cilengitid-DNA-Komplex (**C**) bindet in etwa so gut wie die Binder **bP1** und **bP2**. **C** liefert jedoch bei geringerer Konzentration (100 nM) einen höheren Wert (4.4%) als bei 250 nM (2.9%). Dies könnte an einer Messungenauigkeit liegen, da die Messung nur einmal durchgeführt wurde. Um diese Diskrepanz zu verifizieren müssten die Messungen wiederholt werden. Da diese Auswertung darauf hinweist, dass die Binder mit beiden Antagonisten (**bP1C** und **bP2C**) mit höherer Affinität binden, als ihre monospezifischen Analoga (**bP1**, **bP2** und **C**), wurde aus Zeitgründen dieser Versuch nicht wiederholt. Aus diesen Daten konnte geschlossen werden, dass der zweite Komplex **bP2** besser bindet als **bP1**. Deshalb wurde **bP2** für die nächsten Messungen ausgewählt.

Wie in Abschnitt 4.1.8 gezeigt, kann die Flexibilität eines Systems einen großen Einfluss auf die Bindungsaffinität haben. Die bisher untersuchten Komplexe enthielten ein ungepaartes Nukleotid zwischen den modifizierten Strängen. In den nächsten Messungen wur-

de die Flexibilität der Ligandenpräsentation durch Variation der Anzahl ungepaarter Nukleotide geändert (Abbildung 67).

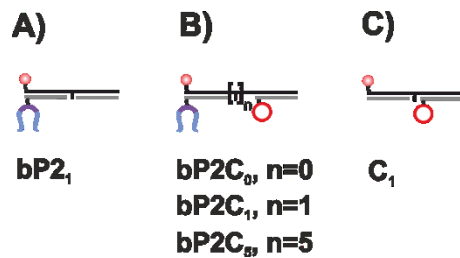


Abbildung 67: Monospezifische und bispezifische Komplexe **bP2C_y**, b: bivalent P2: Peptoid 2, C: Cilengitid, y: Anzahl der ungepaarten Nukleotide. **A)** Monospezifischer Komplex **bP2₁**. **B)** Bispezifische Komplexe mit unterschiedlichen Flexibilitäten. **C)** Monospezifischer Komplex **C₁**.

Wie bereits bei den vorangegangenen Messungen, wurden die Komplexe mit einer Konzentration von 250 nM eingesetzt und zunächst nur die bispezifischen Binder untersucht (Abbildung 68 A). Überraschenderweise erwies sich die nun eingesetzte Konzentration als zu hoch. Zum einen war das Signal deutlich höher, als bei den vorangegangenen Messungen, zum anderen schienen die neuen, kürzeren Komplexe auch ein viel höheres Hintergrundsignal zu verursachen. Um diesem Problem zu begegnen, wurde die Konzentration

4.4 Bispezifische Inhibitoren für das VEGFR2 und das $\alpha_v\beta_3$ -Integrin

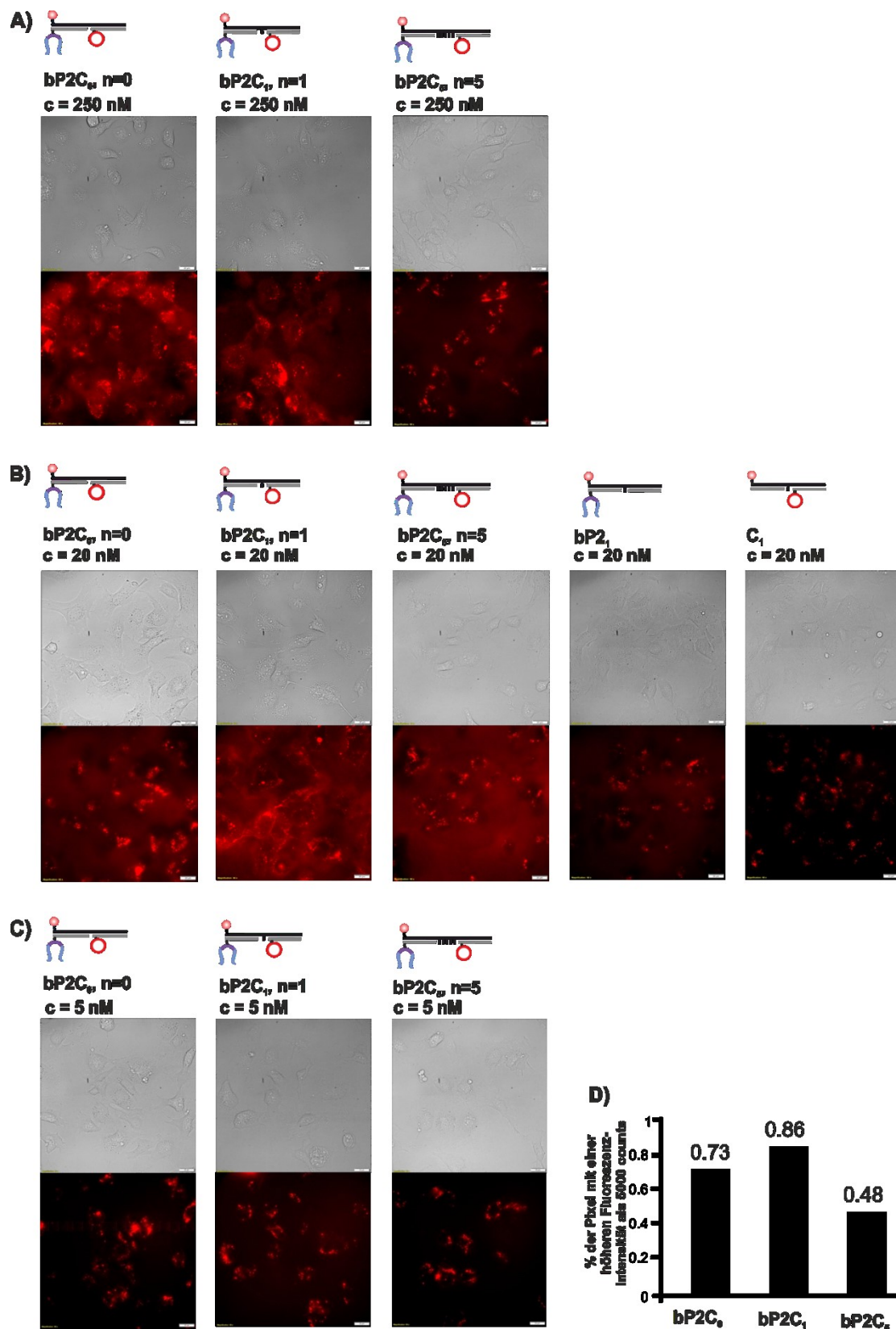


Abbildung 68: Fluoreszenzmikroskopiebilder von HUVEC-Zellen im TRITC-Kanal bei 250 nM (A), 20 nM (B) und 2 nM (C). Bedingungen: 5 min Inkubation in HANKS zusammen mit VEGF (1.3 nM). 5 s Expositionszeit, Graustufenbereich: 5500-15000 für 250 nM, 2000-7000 für 20 nM und 2 nM. 0.1 mg/mL Sperma-DNA, 0.2% BSA, 7 min vor Zugabe der Komplexe. **D)** Anteil der Pixel in %, die einen höheren Wert als 5000 counts haben, bispezifische Komplexe bei 2 nM. Ausgezählt wurden 50-70 Zellen.

4.4 Bispezifische Inhibitoren für das VEGFR2 und das $\alpha_v\beta_3$ -Integrin

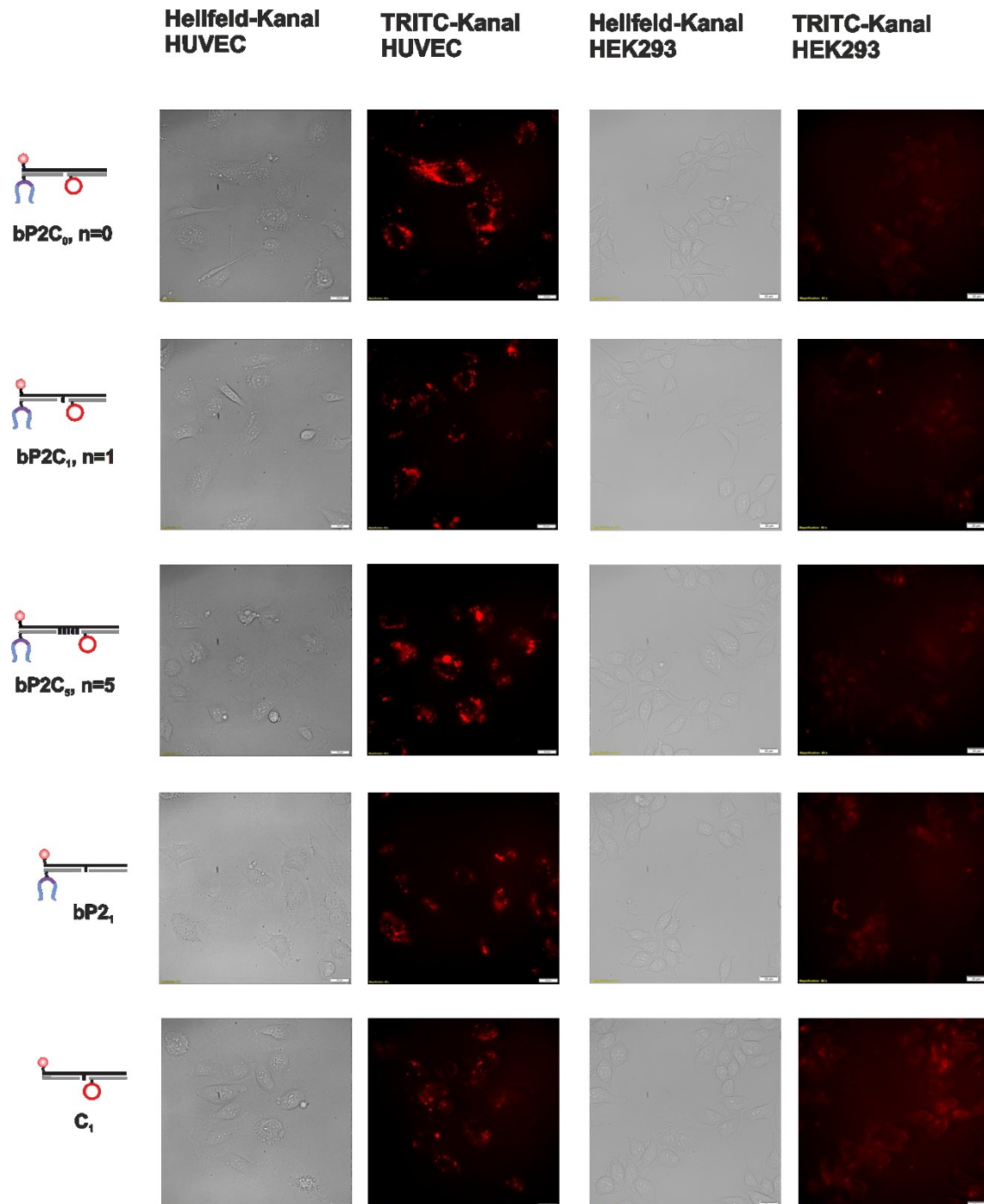


Abbildung 69: Fluoreszenzmikroskopiebilder von HUVEC-Zellen (oben) und HEK293-Zellen (unten) im TRITC-Kanal bei 250 nM der bispezifischen und monospezifischen Komplexe. Bedingungen: 5 min Inkubation in HANKS zusammen mit VEGF (1.3 nM). 3 s Expositionszeit, Graustufenbereich: 2000-8000, 0.1 mg/mL Sperm-DNA, 0.5% BSA, 7 min vor Zugabe der Komplexe.

auf 20 nM (Abbildung 68 B) erniedrigt. Allerdings war das Hintergrundsignal auch bei dieser Konzentration zu hoch. Diesmal wurden auch die monospezifischen Komplexe (**bP2₁** und **C₁**) vermessen. Dabei konnte beobachtet werden, dass ohne Peptoid im Komplex (**C₁**), das Hintergrundsignal deutlich geringer ausfällt. Das Peptoid scheint also für das hohe Hintergrundsignal verantwortlich zu sein. Die Konzentrationen wurden weiter (2 nM) erniedrigt und die Färbung mit den bispezifischen Bindern (**bP2C₀**, **bP2C₁** und **bP2C₅**) untersucht (Abbildung 68 C). Dieses Vorgehen führte zu verbesserten Signal/Rausch-Verhältnissen. Allerdings wurde der Anteil der Pixel mit einem höheren Intensitätswert als 5000 für alle Komplexe auf unter 1% reduziert (Abbildung 68 D). Die Konzentration von 2 nM scheint zu gering.

Die nächsten Messungen wurden bei einer Konzentration von 5 nM durchgeführt. Weiterhin wurde der BSA-Anteil von 0.2% auf 0.5% erhöht, um den Hintergrund noch weiter zu reduzieren. Als Kontrollexperiment wurde eine andere Zelllinie gewählt, die die beiden Rezeptoren nicht überexprimiert. Die HEK293-Zellen exprimieren weder VEGFR2 noch β_3 -Integrin. Lediglich α_v -Integrin (15.8 TPM) wird in einem viel geringeren Ausmaß als bei den HUVEC-Zellen (72.6 TPM) exprimiert.¹⁸⁸ Die aufgenommenen Bilder sind in Abbildung 69 dargestellt und die Bildauswertung wurde wie vorher beschrieben durchgeführt. Es wird deutlich, dass die Komplexe stärker an die HUVEC- als an die HEK293-Zellen binden (Abbildung 70). Die Behandlung mit dem **C₁**- und dem **bP2₁**-Komplex, färbten HEK293-Zellen in sehr geringem Ausmaß an. Bei der HUVEC-Zelllinie kann nun auch eine Aussage über den am stärksten bindenden Komplex gemacht werden. Der rigideste Komplex **bP2C₀** lieferte die stärkste Anfärbung. Die monospezifischen Binder ergaben deutlich schwächere Signale. Interessanterweise färbten die bispe-

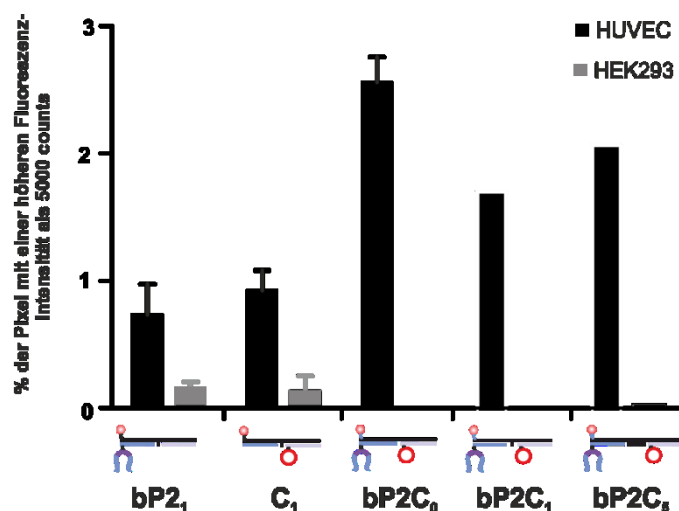


Abbildung 70: Anteil in % der Pixel, die einen höheren Wert als 5000 counts haben. Ausgezählt wurden 50-70 Zellen.

zifischen Komplexe die HEK293-Zelllinie kaum mehr an. Die Anzahl der Pixel, die den Schwellenwert überschreiten, ist bei den HUVEC-Zellen um das 1000-fache höher als bei den HEK293-Zellen. Dies zeigt, dass die Komplexe **bP2C₀**, **bP2C₁** und **bP2C₅** nicht nur besser bindet, sondern wahrscheinlich auch eine höhere Selektivität aufweist. Es ist jedoch verwunderlich, dass die HEK293-Zellen durch monospezifische Komplexe besser angefärbt werden als durch die bispezifischen. Mit den hier durchgeführten Experimenten kann dieser Unterschied nicht erklärt werden. Anzumerken ist, dass die Fehler der Messungen relativ hoch ausfallen. Da die Messungen maximal zwei mal durchgeführt wurden, wäre eine Wiederholung dieses Experiments sinnvoll. Allerdings konnte dies im zeitlichen Rahmen dieser Doktorarbeit leider nicht mehr durchgeführt werden.

4.4.5 Bestimmung des Einflusses auf die VEGFR2-Phosphorylierung

Mit den in Kapitel 4.4.4 vorgestellten Messungen konnte eine Aussage über die Affinität getroffen werden. Um den Einfluss auf die VEGFR2-Phosphorylierung zu untersuchen, wurde ein ELISA-Assay gewählt, mit dem die Änderung der Phosphorylierung bei Präsenz der Komplexe untersucht werden konnte.

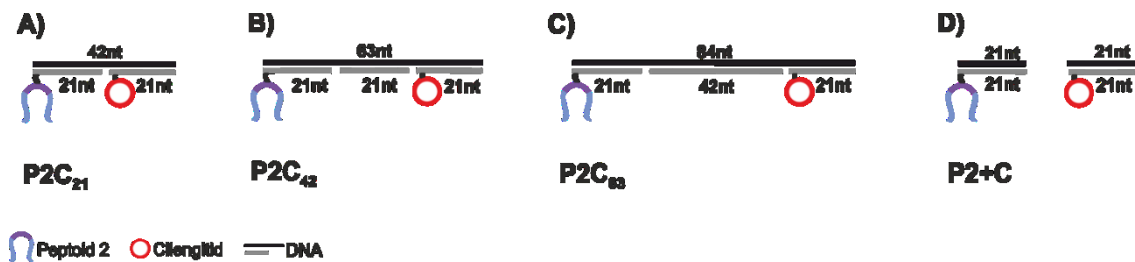


Abbildung 71: Die für den ELISA genutzten Komplexe. **A)** Bispezifischer Komplex mit einem Abstand von 21 nt. **B)** Bispezifischer Komplex mit einem Abstand von 42 nt. **C)** Bispezifischer Komplex mit einem Abstand von 63 nt. **A)** Kontrollkomplex, bei dem die beiden Binder **P2** und **Cilengitid** nicht miteinander verbunden sind.

Diese Messungen sollten mit bispezifischen Komplexen durchgeführt werden, die sich im Abstand der Antagonisten unterscheiden. Alle Komplexe wurden so konstruiert, dass keine ungepaarten Nukleotide im Doppelstrang vorhanden waren, da der rigideste Komplex bei den Mikroskopiemessungen die beste Bindung gezeigt hat. Die Abstände betrugen 21 nt, 42 nt und 63 nt (Abbildung 71 A-C). Als Kontrolle sollte ein System verwendet werden, bei dem die beiden Binder zwar an einem DNA-Doppelstrang angebracht sind, aber nicht miteinander verbunden sind (Abbildung 71 D). Bei diesen Experimenten wurden die Zellen in der gleichen Art und Weise behandelt, wie auch bei den vorangegangenen Messungen. Die HUVEC-Zellen wurden zunächst ausplattiert und vor der Behandlung mit den Komplexen 16-18 h bei 1% FCS ausgehungert. Die Komplexe wurden 8-10 min zusammen mit VEGF (1.3 nM) mit den Zellen inkubiert. Nach der Behandlung wurden die Zellen lysiert, die Proteinkonzentration mittels eines BCA-Assays bestimmt und bis zur Durchführung des ELISA-Assays bei -80 °C aufbewahrt. Für den ELISA wurden Proteinkonzentrationen von 0.15 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (Endkonzentration) benutzt und der Assay wurde mit einem Kit von *cellsignal* durchgeführt. Es wurden verschiedene Konzentrationen der Komplexe von 0.5-2000 nM eingesetzt. Weiterhin wurden bei jeder Messung parallel auch der Wert für die Zellen mit und ohne VEGF aber ohne Komplex bestimmt.

Der Wert der Phosphorylierung mit VEGF war immer doppelt so hoch wie der Wert ohne VEGF. Die erhaltenen Werte für die Komplexe wurden auf den Wert der Zelle mit VEGF normiert und somit konnte ein Ausdruck für die Zu- oder Abnahme der Phosphorylierung erhalten werden. In Abbildung 72 zeigt die Ergebnisse in einem Balkendiagramm. Interessanterweise führt der bispezifische Komplex mit dem kleinsten Abstand **P2C₂₁** zu einer Erhöhung der Phosphorylierung des VEGFR2 und nicht zu einer Erniedrigung, obwohl der Komplex zwei Antagonisten beinhaltet. In der Literatur wird mehrfach eine gegenseitige Aktivierung der beiden Rezeptoren beschrieben.^{9, 154} Wenn $\alpha_v\beta_3$ -Integrin an den VEGFR2-Rezeptor rekrutiert wird, so führt das sowohl zu einer Aktivierung von

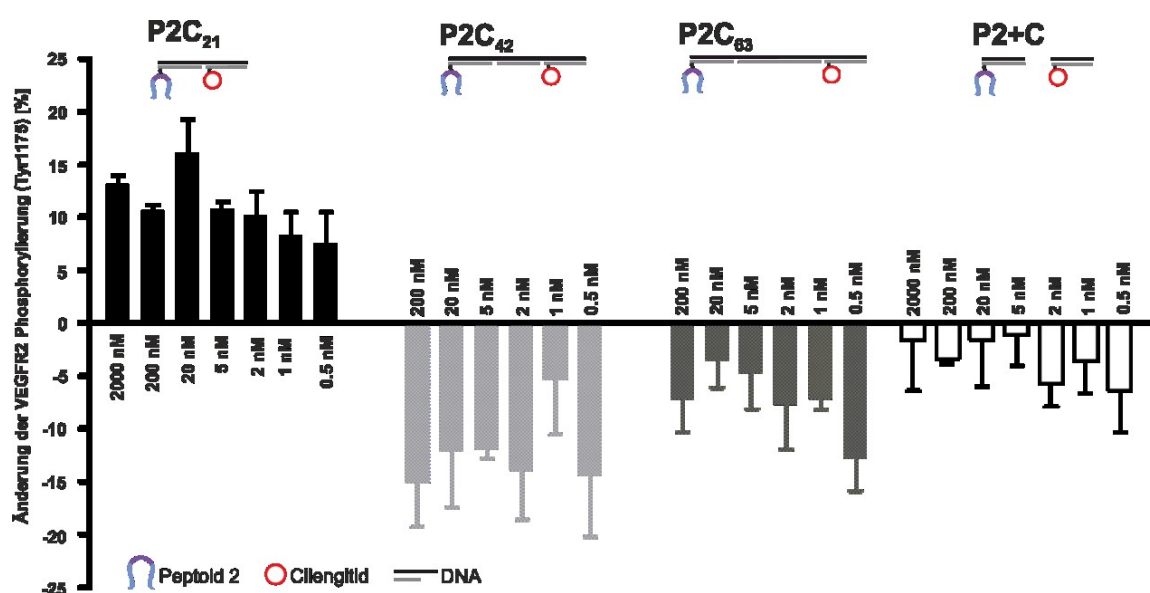


Abbildung 72: Änderung der VEGFR2-Phosphorylierung (Tyr1175) nach der Behandlung mit den Komplexen **P2C₂₁**, **P2C₄₂**, **P2C₆₃** und **P2+C**. Bedingungen: 0.5-2000 nM der Komplexe, 10 min Inkubation in Hanks, 15 µg/µL Proteinlysate. Durchgeführt mit dem ELISA-Kit für VEGFR2 (Tyr1175) von *cellsignal*.

VEGFR2 als auch zu einer Aktivierung des $\alpha_v\beta_3$ -Integrins. Dies könnte auch hier der Fall sein. Obwohl zwei Antagonisten an die Rezeptoren binden, könnte die räumliche Nähe der beiden Rezeptoren zu einer Aktivierung der VEGFR2-Phosphorylierung führen. Werden die Werte für die beiden größeren Abstände mit 42 nt und 63 nt betrachtet, so führen diese Komplexe zu einer Inhibition der VEGFR2-Phosphorylierung, wobei der Komplex mit dem mittleren Abstand **P2C₄₂** zu einer größeren Inhibition führt als der Komplex **P2C₆₃**. Dies lässt sich mit der Abstandsabhängigkeit des bivalenten Effekts begründen. Wie in Kapitel 4.1.8 gezeigt, nimmt der bivalente Effekt mit dem Abstand der Liganden zueinander ab. Somit wird auch bei einem größeren Abstand eine geringere

Inhibition erreicht. Die Inhibition könnte auch durch eine Trennung der beiden Rezeptoren verursacht werden, denn dadurch kann eine gegenseitige Aktivierung nicht mehr erfolgen. Wird der Komplex **P2+C** betrachtet, so kann auch hier eine Erniedrigung der Phosphorylierung erkannt werden. Allerdings sind die negativen Änderungen noch geringer als für den Komplex mit dem größten Abstand **P2C₆₃**. Ein Dosis-Wirkungs-Verlauf lässt sich leider für keinen der hier gemessenen Komplexe erkennen. Dies kann zwei Ursachen haben. Die hier eingesetzten Konzentrationen könnten zu hoch sein. Bei der Verwendung von viel niedrigeren Konzentrationen als 500 pM würde eine Doppelstrangstruktur der DNA-Konjugate nicht mehr zu 100% vorliegen, da die Schmelztemperatur hierfür nicht ausreichen würde. Ein viel wahrscheinlicher Grund für das Fehlen des Dosis-Wirkungs-Verlaufs sind die hohen Fehler der einzelnen Werte. Der BCA-Assay, der für die Proteinbestimmung verwendet wurde, war leider nicht sensitiv und damit präzise genug bei den hier verwendeten Proteinkonzentrationen und da der erhaltene ELISA-Wert von dieser Konzentration abhängt, schlägt sich das direkt auf die Messergebnisse nieder. Dieses Problem könnte durch die Verwendung von größeren Mengen an Protein pro Messpunkt behoben werden. Dafür sind allerdings zwangsläufig auch größere Mengen der Komplexe notwendig, da dafür größere Zellkulturschalen verwendet werden müssten. Eine weitere Möglichkeit den Fehler zu minimieren, wäre die Verwendung von einem sensitiveren Assay für die Proteinbestimmung oder die Verwendung einer internen Referenz, die als Vergleichswert dient.

Auch wenn kein Dosis-Wirkungs-Verlauf aus den Messdaten erhalten werden konnte, so können wichtige Informationen aus den Messungen gezogen werden. Diese zeigten, dass die Verwendung von bispezifischen Bindern zu einer höheren Inhibition führen kann. Diese Inhibition kann jedoch stark vom Abstand der Antagonisten abhängen. Sind diese zu nah aneinander, so könnte es zu einer Aktivierung statt zu einer Inhibition führen, da die Rezeptoren in räumliche Nähe gebracht werden und sich gegenseitig aktivieren. Die hier erhaltenen Ergebnisse deuten an, dass dieses Modellsystem nicht nur inhibieren, sondern auch aktivieren kann, je nachdem wie groß der Abstand der Binder zueinander gewählt wird.

Dieses System könnte auf viele weitere Rezeptoren übertragen werden und somit eine Methodik entwickelt werden, durch die untersucht werden kann, ob zwei Rezeptoren miteinander interagieren, wenn sie in räumliche Nähe zueinander gebracht werden. Dies

4.4 Bispezifische Inhibitoren für das VEGFR2 und das $\alpha_v\beta_3$ -Integrin

stellt eine hohe Anwendungsbreite dar. Somit können mit einem solchen Modellsystem nicht nur selektive Therapeutika entwickelt werden, sondern auch untersucht werden, ob eine Interaktion zwischen bestimmten Rezeptoren besteht.

4.5 Zusammenfassung: Bispezifische Binder

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die Synthese eines bispezifischen Binders, der sowohl VEGFR2 als auch $\alpha_v\beta_3$ -Integrin binden kann, beschrieben und auf seine Bindungsfähigkeit und Funktion getestet. Es wurde ein monovalentes und ein bivalentes Peptoid an DNA konjugiert. Weiterhin wurde ein Cilengitid-DNA-Konjugat hergestellt, welches als Antagonist für das $\alpha_v\beta_3$ -Integrin dient. Durch Verwendung von unterschiedlichen Templates konnten somit mono- und bispezifische Binder erhalten werden. Diese wurden zunächst auf ihre Bindungsfähigkeit mit Hilfe von Fluoreszenzmikroskopie geprüft. Dabei stellte sich heraus, dass Binder **bp2** hellere Fluoreszenzsignale an HUVEC-Zellen verursacht als Binder **bp1**. Anschließend wurde die Flexibilität des Systems variiert. Dies zeigte, dass der Komplex mit dem starrsten DNA-Gerüst am stärksten an die HUVEC-Zelllinie bindet. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass der bispezifische Binder nicht nur stärker (etwa 3-mal) an die HUVEC-Zellen bindet als die monospezifischen Binder **C₁** und **bp2**, sondern auch selektiver zu sein scheint. Dafür wurden Messungen mit einer anderen Zelllinie, (HEK293-Zelllinie), die die beiden Rezeptoren nicht überexprimiert, durchgeführt. Die bispezifischen Konstrukte banden etwa 100-fach geringer an die HEK293-Zellen als an die HUVEC-Zellen. Im Gegensatz dazu führten die monospezifischen Binder **C₁** und **bp2** nur zu einem etwa 6-fach geringeren Fluoreszenzsignal bei den HEK293-Zellen als bei den HUVEC-Zellen.

Schließlich wurden Untersuchungen zum Einfluss der bispezifischen Binder auf die VEGFR2-Phosphorylierung mit einem ELISA-Assay durchgeführt. Für diese Messungen wurden drei bispezifische Binder mit unterschiedlichen Abständen (21 nt, 42 nt und 63 nt) vermessen und mit einem Komplex verglichen, bei dem die Liganden nicht miteinander verbunden waren. Überraschenderweise aktivierte der Komplex mit dem kleinsten Abstand (**P2C₂₁**) die VEGFR2-Phosphorylierung. Dies lässt sich dadurch erklären, dass sich die beiden Rezeptoren, wenn sie in räumliche Nähe zueinander gebracht werden, gegenseitig aktivieren können. Wird der Abstand der Antagonisten auf 42 oder 63 nt erhöht, so wird, wie erwartet, eine Inhibition der beiden Binder erhalten. Dabei verursachte der Komplex mit dem kürzeren Abstand (**P2C₄₂**) höhere Inhibitionsraten als der Komplex mit dem größeren Abstand (**P2C₆₃**). Der Komplex, bei dem die beiden Binder nicht mit-

einander verbunden waren (**P2+C**) führte zwar auch zu einer Inhibition, jedoch war diese schwächer ausgeprägt als bei den bispezifischen Komplexen (**P2C₄₂** und **P2C₆₃**).

Aus den ELISA-Assays konnten keine Bindungsaffinitäten bestimmt werden, da die Fehler, aufgrund geringer Proteinkonzentrationen, zu hoch waren. Allerdings konnte entweder eine Inhibition oder Aktivierung der Phosphorylierung beobachtet werden. Es war möglich, mit dem gleichen bispezifischen Antagonisten, nur durch Änderung der Abstände der Binder, eine Aktivierung oder eine Inhibition der Phosphorylierung zu erhalten. Dies könnte eine neue Methodik bei der Untersuchung von Proteininteraktionen darstellen.

5 Zusammenfassung und Ausblick

5.1 Zusammenfassung

Aufgrund der hohen Affinität und Spezifität multivalenter Systeme werden diese sowohl in der Natur als auch von Chemikern vielfach verwendet. Die Untersuchung solcher Systeme verspricht somit nicht nur ein besseres Verständnis biomolekularer Prozesse, sondern auch die Fähigkeit bessere hochaffine und selektive Liganden für neue Anwendungen herzustellen. Allerdings ist das Verständnis der exponentiellen Bindungsverstärkung multivalenter Systeme nicht trivial und die Untersuchung solcher Bindungen ist noch nicht abgeschlossen. Im ersten Teil dieser Arbeit sollte daher die räumliche Reichweite der Bivalenz in Abhängigkeit der Bindungsstärke untersucht werden. In vielen biologischen Systemen sind Bindungsstellen sehr weit voneinander entfernt. Dies lässt vermuten, dass die Natur mit Absicht diese Anordnung wählt, um multimolekulare Bindungsmodi zu ermöglichen. Neben der Reichweite sollten auch die Faktoren untersucht werden, die verbrückende Bindungsweisen ermöglichen. Der zweite Teil der Arbeit befasst sich mit der Untersuchung eines bispezifischen Binders, der gleichzeitig zwei Rezeptoren, das VEGFR2 und das $\alpha_v\beta_3$ -Integrin, binden kann. Diese beiden Rezeptoren werden in Krebszellen überexprimiert und interagieren miteinander. Eine Inhibition beider mit nur einem Konstrukt verspricht nicht nur eine höhere Affinität, sondern auch eine höhere Selektivität gegenüber Krebszellen.

Reichweite der Bivalenz

Der erste Teil dieser Arbeit befasste sich mit der Reichweite der Bivalenz in Abhängigkeit der monovalenten Bindungsstärke. Dass multi- oder bivalente Binder synergetisch auch über große Distanzen interagieren können wurde bisher nicht systematisch untersucht. Weiterhin wurde bisher nicht untersucht, ob diese Synergie von der monovalenten Interaktionsstärke abhängt. Diese Erkenntnisse würden helfen die Planung und die Herstellung neuer bivalenter Binder und Inhibitoren deutlich zu vereinfachen.

Zunächst sollte ein geeignetes Modellsystem gefunden werden, mit dem eine systematische Studie durchgeführt werden kann. Aufgrund ihrer hohen Persistenzlänge und der präzisen Einstellbarkeit von Ligandenabständen stellt DNA für dieses Projekt ein ausgezeichnetes Gerüst dar. Eine Hauptanforderung an das Ligand/Rezeptor-Paar bestand in der fehlenden Interaktion mit der DNA. Gast-Wirt-Komplexe bieten sich hierfür an. Auch wenn der Aufbau zunächst relativ trivial wirkt, stellte die Findung des passenden Modellsystems eins der Hauptschwierigkeiten dieses Projekts dar. Als Wirte wurden hierbei entweder β -Cyclodextrin oder Cucurbit[7]uril genutzt. Als Gäste wurden entweder die Farbstoffe Rhodamin B oder Pyronin B oder die Adamantanamine Amantadin und Adamantanethyldiamin gewählt. Die kovalente Anbringung der Gäste und der Wirte an DNA ermöglichte die Konstruktion vieler verschiedener monovalenter und bivalenter Systeme mit unterschiedlichen Abständen.

Das erste Modellsystem bestand aus dem Wirt β -Cyclodextrin und dem Gast Rhodamin B (Abbildung 73 A). Bei der Bindung von Rhodamin B an β -Cyclodextrin erniedrigt sich die Fluoreszenzintensität von Rhodamin B. Somit sollten durch die Messung von Rhodamin B-DNA-Komplexen bei verschiedenen Konzentrationen von β -Cyclodextrin-DNA-Komplexen die Bindungskonstanten der monovalenten und bivalenten Systeme bestimmt werden. Durch die moderaten Bindungskonstanten von Rhodamin B und β -Cyclodextrin mussten jedoch relativ hohe Konzentrationen eingesetzt werden. Dies

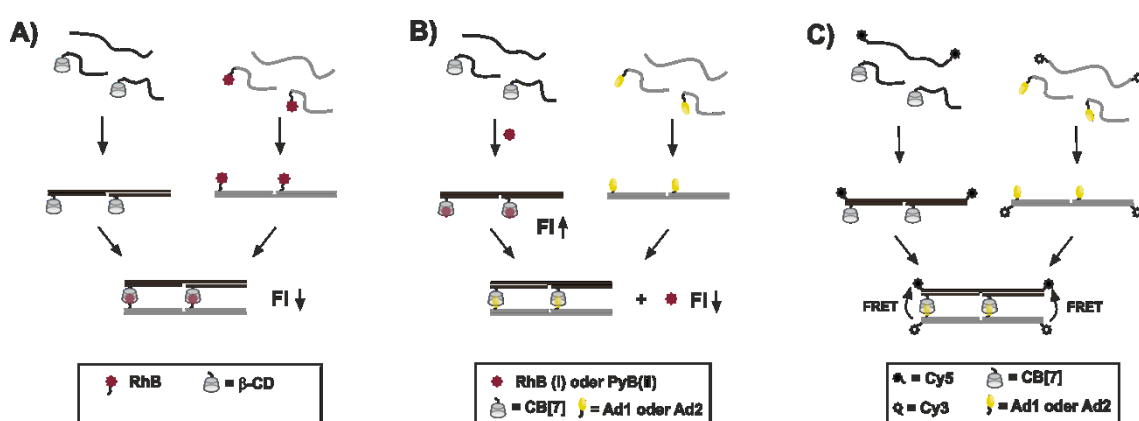


Abbildung 73: Modellkomplexe zur Untersuchung der Reichweite der Bivalenz. **A)** β -Cyclodextrin (β -CD) und Rhodamin B-modifizierte DNA wurde zu bivalenten Komplexen durch die Verwendung passender Template hybridisiert. Durch die Ausbildung der Gast-Wirt-Komplexe sinkt die Fluoreszenzintensität (FI) von RhB. **B)** CB[7] und zwei verschiedene Adamantan-modifizierte DNA-Konjugate wurden zu bivalenten Komplexen durch die Verwendung passender Template hybridisiert. Entweder Rhodamin B (RhB, i) oder Pyronin B (PyB, ii) binden an CB[7]-DNA, wodurch ihre FI erhöht wird. Mit Adamantan-modifizierter DNA können die Farbstoffe aus dem Käfig verdrängt werden, wodurch die FI wieder sinkt. **C)** CB[7] und zwei verschiedene Adamantan-modifizierte DNA-Konjugate wurden zu bivalenten Komplexen durch die Verwendung passender Template hybridisiert. Das Templat von CB[7] ist mit Cy5 markiert. Das Templat der Adamantan-DNA ist mit Cy3 markiert. Durch die Ausbildung der Gast-Wirt-Komplexe werden die beiden Farbstoffe räumlich nahegebracht, wodurch ein FRET-Effekt entsteht.

machte eine Bestimmung der monovalenten Dissoziationskonstante nicht möglich, da bei hohen Konzentrationen andere Rhodamin B-DNA-Wechselwirkungen stattfanden, die die Fluoreszenzintensität des Rhodamin B's beeinflussten. Der Einsatz von Cucurbit[7]uril versprach die Verwendung von niedrigeren Konzentrationen, da das CB[7] stärkere Gast-Wirt-Komplexe ausbilden kann als β -Cyclodextrin. Das zweite Modellsystem basierte auf einem Verdrängungsexperiment. Rhodamin B bindet ebenfalls an CB[7], jedoch mit einer höheren Affinität. Dieses sollte dann entweder mit Ad1-DNA oder Ad2-DNA aus dem Käfig des CB[7] verdrängt werden (Abbildung 73 B). Hierbei konnten zwar viel geringere Konzentrationen eingesetzt werden und Rhodamin B schien bei diesen Bedingungen nicht mit der Gerüst-DNA zu interagieren, jedoch konnte keine exponentielle Bindungsverstärkung des bivalenten Systems im Vergleich zum monovalenten System beobachtet werden. Dies ließ vermuten, dass die verwendeten Konzentrationen von Wirt und Farbstoff zu hoch waren. In diesem Fall verdrängt schon der monovalente Binder so gut, dass ein bivalenter Effekt nicht beobachtet werden kann. Somit musste mit Pyronin B ein Farbstoff gewählt werden, der eine deutlich stärkere Bindung zu CB[7] aufweist (Abbildung 73 B). Auch hier wurde dasselbe Problem beobachtet, wie schon zuvor mit Rhodamin B. Berechnungen von Susanne Liese aus dem AK Netz bestätigten die Vermutung der zu hohen verwendeten Konzentrationen. Um einen bivalenten Effekt bei diesem System zu beobachten, hätten geringere Konzentrationen eingesetzt werden müssen. Dies war jedoch durch das resultierende schlechte Signal/Rausch-Verhältnis nicht möglich. Letztendlich führte ein viertes Modellsystem zum Erfolg. Hier wurden wieder, wie bei dem ersten Modellsystem, Dissoziationskonstanten gemessen. Allerdings wurden die Wirt-Template mit einem Cy5- und die Gast-Template mit einem Cy3-Farbstoff markiert. Bei der Ausbildung der Bindung, wurde ein FRET-Effekt beobachtet (Abbildung 73 C). Die hohe Bindungsaffinität zwischen CB[7] und Adamantan ließ sehr geringe Konzentrationen zu, sodass andere Wechselwirkungen vermieden werden konnten. Die erhaltenen Bindungsaffinitäten sind in Abbildung 74 zusammengefasst. Um den Einfluss der monovalenten Bindungsstärke zu untersuchen, wurden zwei verschiedene Adamantankomplexe, Ad1 und Ad2, gewählt. Es wurde ein K_D -Wert von 66 nM für den monovalenten Binder Ad1 erhalten. Ad2 bindet etwa 10-mal schwächer (700 nM) an den monovalenten CB[7]-Komplex. Für beide Binder wurde ein bivalenter Effekt beobachtet. Jedoch wurde eine höhere bivalente Verstärkung für Binder Ad1 (etwa 10mal stärker) als für Ad2 erhalten. Folglich besteht eine Abhängigkeit des bivalenten Effekts von der monovalenten

Bindungsstärke. Um die Distanzabhängigkeit des bivalenten Effekts zu untersuchen, wurden die Dissoziationskonstanten auch für längere Abstände vermessen. Für beide Binder nahm die Affinität mit dem Abstand ab. Allerdings hat der schwächere Binder Ad2 bereits bei einem Abstand von 42 nt keine bivalente Verstärkung mehr gezeigt, während der stärkere Binder Ad1 auch noch bei sehr großen Abständen einen Bivalenzeffekt aufwies. Erst bei einem Abstand von 84 nt sank der K_D -Wert auf ungefähr die Hälfte des monovalenten Werts. Die Erhöhung der Flexibilität im System führte bei beiden Bindern zu einer Verschlechterung der Bindungsaffinität.

Crosslinking

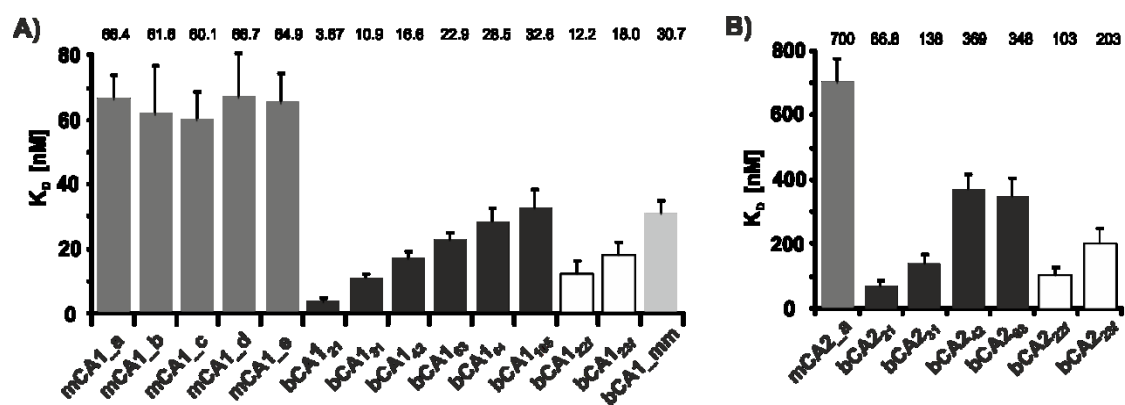


Abbildung 74: Dissoziationskonstanten (K_D [nM]) für die Bindungssysteme, für die Binder **A)** Ad1 und **B)** Ad2. Bedingungen: 10 nM Adn-DNA, 0-4 μ M CB[7]-DNA in Puffer (10 mM NaH_2PO_4 , 5 mM MgCl_2 , pH 7.5).

Bivalente Systeme können entweder bimolekular oder multimolekular (Quervernetzung) binden. Bimolekulare Bindungsweisen profitieren oftmals von einer bivalenten Verstärkung. Allerdings gibt es zahlreiche Beispiele in der Natur, in denen bivalente Binder multimolekulare Komplexe ausbilden, so wie beispielsweise das AP2 in der Clathrin-vermittelten Endocytose. In diesem Abschnitt wurden die Faktoren, die zu einer multimolekularen Bindungsweise führen, untersucht. Es wurde das gleiche Modellsystem verwendet, wie auch für die Bestimmung der Reichweite der Bivalenz, nur die fluoreszente Markierung wurde geändert. Somit wurde dann ein FRET-Effekt induziert, wenn das System multimolekulare Komplexe ausbildete. Hierbei wurden verschiedene Konzentrationen (10-200 μ M), Binder (Ad1 und Ad2), Abstände (21 nt und 63 nt) und Flexibilitäten (0 und 2 ungepaarte Nukleotide) der Komplexe untersucht. Zunächst konnte beobachtet werden, dass eine Quervernetzung nur bei hohen Konzentrationen auftrat und der Anteil verbrückender Bindungsmodi mit zunehmender Konzentration stieg. Der stärkere Binder

Ad1 zeigte deutlich weniger Quervernetzung als der schwächere Binder Ad2. Längere Abstände und Flexibilitäten erzeugten ebenfalls einen Anstieg der verbrückenden Bindungsweise. Da bimolekulare und multimolekulare Bindungsmodi immer in Konkurrenz zueinanderstehen, ist eine Quervernetzung nur dann möglich, wenn der bivalente Effekt kaum oder gar nicht ausgeprägt ist. Mit dieser Untersuchung konnte gezeigt werden, wie die Natur multimolekulare Komplexe auszubilden kann. Sie muss schwache Binder in einem großen Abstand zueinander präsentieren und vorzugsweise durch ein flexibles Gerüst miteinander verbinden.

Biselektive Binder

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde ein bispezifischer Binder, der sowohl VEGFR2 als auch $\alpha_v\beta_3$ -Integrin binden kann, hergestellt und auf seine Affinität, Selektivität und Einfluss auf die Phosphorylierung des VEGFR2 untersucht. Als Antagonisten für das VEGFR2 wurde ein vom Arbeitskreis um Kodadek beschriebenes Peptoid (**GU40C**) genutzt¹¹⁴ und als Antagonisten für $\alpha_v\beta_3$ -Integrin wurde Cilengitid¹⁴⁷ gewählt. Beide Liganden wurden mit einem Azid modifiziert und durch CuAAC an eine Alkin-modifizierte DNA konjugiert. Durch Verwendung passender Template konnten nun monospezifische und bispezifische Binder erhalten werden (Abbildung 75 A und B). Die Bindungsmessungen an VEGFR2 und an $\alpha_v\beta_3$ -Integrin wurden an HUVEC-Zellen durchgeführt, da diese Zelllinie beide Rezeptoren überexprimiert. Eine fluoreszente Markierung war hierbei durch ein Atto565- markiertes DNA-Templat gegeben. Zusätzlich wurden verschiedene Gerüstflexibilitäten (keine ungepaarten Nukleotide, ein ungepaartes Nukleotid und fünf ungepaarte Nukleotide) durch die Verwendung von längeren Templaten untersucht. Die Ergebnisse der Messungen zeigten, dass alle bispezifischen Konstrukte in der Lage waren stärker an HUVEC Zellen zu binden als die monospezifischen Komplexe (Abbildung 75 C). Das beste Ergebnis erzeugte der rigideste Komplex ohne ungepaarte Nukleotide. Dieser erzeugte ein höheres Fluoreszenzsignal als die flexibleren Binder und zeigte eine stärkere Bindung auf als die monospezifischen Binder (Abbildung 75 C).

Wie bereits oben erwähnt, kann ein Antagonist, der zwei Rezeptoren adressieren kann, zu einer höheren Selektivität führen. Um dies zu untersuchen, wurde eine weitere Zelllinie vermessen. HEK293 Zellen exprimieren weder VEGFR2 noch β_3 -Integrin und die Expressionsrate von α_v -Integrin ist viel geringer als in HUVEC-Zellen. Aus diesem Grund wurde diese Zelllinie gewählt, um den Selektivitätseinfluss des bispezifischen Binders im Vergleich zu den monospezifischen zu untersuchen. Die Experimente wurden analog zu den Experimenten mit den HUVEC-Zellen durchgeführt. Es zeigte sich eine höhere Selektivität aller bispezifischen Binder im Vergleich zu den monospezifischen. Das Signal der Fluoreszenzintensität für die bispezifischen Binder ist um etwa 1000-fach geringer als bei den HUVEC-Zellen, während die monospezifischen Binder nur etwa 6-fach schwächer an HEK293-Zellen binden (Abbildung 75 C). Warum dies der Fall ist konnte mit diesen Experimenten nicht ausreichend geklärt werden. Allerdings sind die Fehler der

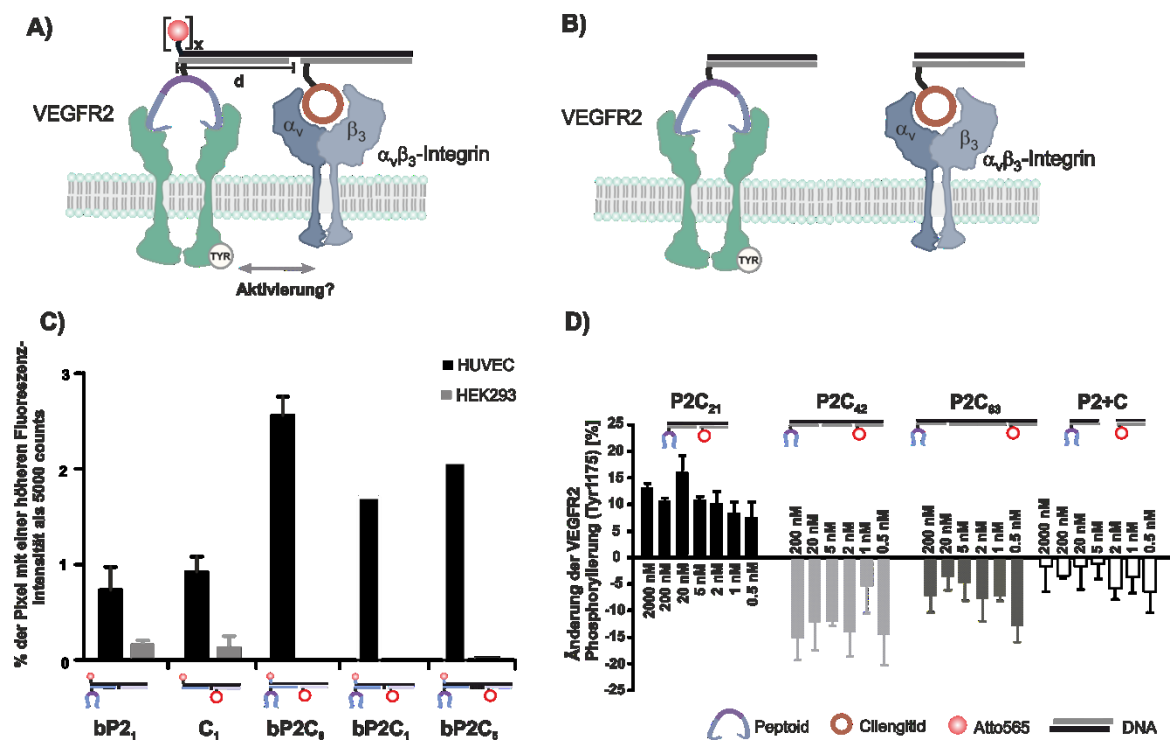


Abbildung 75: Modellsysteme und Ergebnisse der bispezifischen Binder. **A)** Bispezifischer Binder (P2C_γ) (γ = Anzahl der Nukleotide, die die beiden Binder voneinander trennen), die simultan das VEGFR2 und $\alpha_v\beta_3$ -Integrin binden. Der DNA-Komplex beinhaltet ein Peptoid, welches das VEGFR2 und ein Cilengitrid, welches das $\alpha_v\beta_3$ -Integrin binden kann. Der Abstand der beiden Binder (d) kann durch die Verwendung verschiedener DNA-Template eingestellt werden. Eine mögliche Markierung mit Atto565 (x=1) ermöglicht Fluoreszenzmikroskopiemessungen. **B)** Monospezifische Binder (P+C), die separat an VEGFR und $\alpha_v\beta_3$ -Integrin binden können und die beiden Rezeptoren nicht in räumliche Nähe bringen. **C)** Ergebnisse der Fluoreszenzmikroskopiemessungen. Es wurden mindestens 50 Zellen ausgezählt. Die HUVEC und die HEK293-Zellen wurden mit Atto565 markierten monospezifischen und bispezifischen (verschiedene Flexibilität) behandelt. **D)** Ergebnisse des ELISA-Assays. Gemessen wurde die VEGFR2-Phosphorylierung nach der Behandlung der bispezifischen Komplexe (P2C_γ) oder der monospezifischen Komplexe (P2+C).

Werte für die HEK293-Zellen relativ groß. Somit müsste für eine verlässliche Aussage das Experiment wiederholt werden. Schlussendlich sollte der Einfluss der bispezifischen Binder auf die VEGFR2-Phosphorylierung mit einem ELISA-Assay untersucht werden. Hierbei wurden bispezifische Binder mit drei verschiedenen Abständen (21 nt, 42 nt und 63 nt) untersucht und mit einem System, indem beide Binder nicht durch ein Gerüst miteinander verbunden sind (**P2+C**), verglichen. Der Binder mit dem geringsten Abstand (**P2C₂₁**) verursachte eine Erhöhung der VEGFR2-Phosphorylierung (Abbildung 75 D), die beiden Komplexe mit dem größeren Abstand (**P2C₄₂** und **P2C₆₃**) und der Kontrollkomplex (**P2+C**) hingegen eine Erniedrigung, wobei Komplex **P2C₄₂** die größte Erniedrigung und Komplex **P2+C** die kleinste Erniedrigung aufwies. Dies passt gut zu den Ergebnissen aus dem ersten Teil dieser Arbeit. Der Bivalenzeffekt nimmt mit dem Abstand ab und somit erscheint es logisch, dass der Komplex **P2C₄₂** eine höhere Inhibition verursacht als **P2C₆₃** oder **P2+C**, die von keiner bivalenten Verstärkung profitieren. Die Aktivierung der VEGFR2-Phosphorylierung durch **P2C₂₁** lässt sich durch eine gegenseitige Aktivierung der beiden Rezeptoren bei der Rekrutierung von $\alpha_v\beta_3$ -Integrin an VEGFR2 erklären, welche bereits mehrfach in der Literatur beschrieben worden ist.⁹ Die Komplexe mit den größeren Abständen halten die beiden Rezeptoren auf Abstand und verhindern eine gegenseitige Aktivierung. Es war somit nicht nur möglich eine höhere Inhibition der VEGFR2-Phosphorylierung durch die Verwendung von bispezifischen Bindern zu erreichen, sondern auch die Zu- oder Abnahme der Phosphorylierung durch die Einstellung verschiedener Abstände der Antagonisten zu kontrollieren. In diesem Teil der Arbeit wurde somit nicht nur ein potenter Antagonist hergestellt, sondern auch ein Modellsystem entwickelt, durch das die Aktivierung oder Deaktivierung von Rezeptoren gezielt gesteuert werden kann.

Zusammenfassend wurden in dieser Arbeit die folgenden wissenschaftlichen Erkenntnisse gewonnen:

- I. Es gibt eine räumliche Grenze der Bivalenz, die von den folgenden Faktoren abhängt:
 - a. Abstand der beiden Liganden/Rezeptor-Module
 - b. Stärke der monovalenten Interaktionspartner
 - c. Flexibilität des Gerüsts

- II. Multimolekulare Strukturen bivalenter Binder können nur unter folgenden Umständen ausgebildet werden:
 - a. Hohe Konzentrationen
 - b. Schwache monovalente Interaktionspartner
 - c. Geringe oder gar keine bivalente Verstärkung
- III. Konstruktion eines bispezifischen Binders, der sowohl VEGFR2 als auch $\alpha_v\beta_3$ -Integrin binden kann. Der bispezifische Binder wies sowohl eine höhere Affinität, als auch eine höhere Selektivität auf.
- IV. Je nach Abstand der beiden Binder konnte entweder eine Aktivierung oder eine Inhibition eines Rezeptors verursacht werden. Somit können solche bispezifische Binder für die Untersuchung von Rezeptor-Rezeptor-Interaktionen eingesetzt werden.

5.2 Ausblick

Der erste Teil dieser Arbeit befasste sich mit der Fragestellung, ob es eine räumliche Grenze der Bivalenz gibt. Diese wurde ausführlich bearbeitet und benötigt keiner weiteren Untersuchung. Durch diese Erkenntnisse können viele bivalente Proteine untersucht werden, die ihre Bindungsstellen in großen Abständen präsentieren. Weitere Adapterproteine oder auch andere Proteine, die Cluster ausbilden, könnten hierbei Gegenstand der Forschung sein. Weiterhin wurde mit diesen Ergebnissen eine gute Grundlage für das Design bivalenter Bindern erarbeitet.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde ein bispezifischer Binder vorgestellt, der eine höhere Affinität und Selektivität aufwies als seine monospezifischen Analoga. Die hier vorgestellten Daten wurden teilweise nur einmal wiederholt, da der zeitliche Rahmen dieser Doktorarbeit weitere Experimente nicht ermöglichte. Eine weitere Wiederholung mancher Messungen wäre daher sinnvoll. Die ELISA-Messungen sollten weiterhin in einem größeren Maßstab durchgeführt werden. Die Fehler dieser Messungen sind relativ groß, da nur eine geringe Menge des Proteins eingesetzt werden konnte. Die Synthese der Binder in einem größeren Maßstab würde auch das Arbeiten mit einer größeren Menge an Lysat erlauben, was höchstwahrscheinlich zu verlässlicheren Werten führen würde. Möglicherweise wäre auch dann eine Aussage über einen IC₅₀-Wert der bispezifischen und monospezifischen Binder möglich. Weiterhin wurde hierbei nur die Phosphorylierung des VEGFR2-Rezeptors untersucht. Äußerst interessant wäre ebenfalls die Untersuchung der β_3 -Integrin Phosphorylierung bei der Zugabe des bispezifischen Binders. Die Verwendung von DNA hat zwar viele Vorteile, wie eine relativ einfache Modifizierung, Biokompatibilität und sehr gute Löslichkeit in Wasser, allerdings hat sie auch die Limitierung des Einsatzes bei sehr geringen Konzentrationen im unteren pikomolaren Bereich, da dann eine vollkommene Ausbildung des Doppelstranges nicht mehr gewährleistet werden kann. Längere Stränge könnten hierfür eine Lösung darstellen. Damit jedoch auch kürzere Abstände eingestellt werden können, müsste einerseits der Binder in der Mitte der Sequenz angebracht werden und andererseits eine Doppelmodifizierung durchgeführt werden. Eine andere Strategie wäre die Verwendung von PNA/DNA-Assemblierungen, die eine deutlich höhere thermische Stabilität bei gleicher Nukleotid-Anzahl aufweisen. Diese Assemblierungen hätten noch einen weiteren Vorteil. Da eine unerwünschte Pepto-

id/DNAds-Interaktion, durch die negative Ladung der DNA, beobachtet werden konnte, sollte eine Interaktion mit den neutralen PNA/DNA-Doppelsträngen und den Peptoiden nicht stattfinden. Das $\alpha_v\beta_3$ -Integrin und auch das VEGFR2 bilden auf HUVEC Zellen multimolekulare Strukturen aus. Dahingehend wäre es interessant die bispezifischen Binder multimolekular auf einem DNA-Gerüst zu präsentieren, um die Affinität und Selektivität möglicherweise noch weiter zu erhöhen.

Weiterhin könnten mit diesem System noch weitere Rezeptor-Rezeptor-Interaktionen untersucht werden.

6 Experimenteller Teil

6.1 Materialien

6.1.2 Reagenzien

Chemikalien für die DNA-Synthese, wie Acetonitril (Wassergehalt < 30 ppm), DMT-Abspaltreagenz (3% Trichloressigsäure in Dichlormethan) Capping Reagenzien I und II (1-Methylimidazol/THF und Acetanhydrid/Pyridin/THF) und oxidierungs Reagenz (Iod/Wasser/Pyridin/THF) wurden von CARL ROTH erworben.

Die DNA-Monomere (DMT-dA(Bz)- β -cyanoethylphosphoramidit, DMT-dC(Bz)- β -cyanoethylphosphoramidit, DMT-dG(DMF)- β -cyanoethylphosphoramidit und DMT-dT- β -cyanoethylphosphoramidit wurden von PROLIGO SIGMA ALDRICH erworben und in der Synthese in einer Konzentration von 0.1 M in Acetonitril eingesetzt. Hyacinth-DMF (5-Benzylmercaptotetrazol) von EMP-BIOTECH wurde in einer Konzentration von 0.3 M in Acetonitril als Kupplungsreagenz eingesetzt.

Die vorbeladenen Nukleotid-Harze Bz-dA SynBase, Bz-dC SynBase, ^tBu-dG SynBase und dT-SynBase, sowie der 5'-Thiol-Modifier C6-CE Phosphoramidit wurden von LINK-TECH erworben, wobei der 5'-Thiol-Modifier C6-CE Phosphoramidit in einer Konzentration von 0.1 M in der automatisierten DNA-Synthese eingesetzt wurde. Der C-10-Carboxymodifier wurde von GLENRESEARCH erworben und ebenfalls in einer Konzentration von 0.1 M eingesetzt. Das alkinmodifizierte Harz für die DNA-Synthese wurde von LUMIPROBE erworben.

F-moc geschützte Aminosäuren wurden von BIOSOLVE, Fmoc-Lys(Mtt)-OH von IRIS BIOTECH und Fmoc-Lys(N₃)-OH von SIGMA ALDRICH erworben. Rink-Amid Harz (Beladung: 0.2 mmol/g) wurde von NOVABIOCHEM und Chlorotriethylchlorid Harz (Beladung: 1.3-1.8 mmol/g) von SIGMA ALDRICH erworben. HCTU wurde von Chemcube, HOAt von SIGMA ALDRICH und TBTU von CARL ROTH erworben. Borsäure für die Peptidsynthese wurde von CARL ROTH, 1-Azid-3-Aminopropan, Boc-1,4-diaminobutan, Isobutylamin,

Piperinylamin und Phenylbutylamin wurden von SIGMA ALDRICH und DIC wurde von CARBOLUTION erworben.

Die Reagenzien für Puffer wurden von CARL ROTH (Borsäure, Glycin, Magnesiumchlorid Hexahydrat, Guanidinium und EDTA), FISCHER BIOREAGENTS (TRIS), MERCK (Natriumhydrogenphosphat) und SIGMA ALDRICH (SDS, Glycerol, HEPES) erworben.

Die HUVEC-Zelllinie und die HEK293-Zelllinie wurden entweder von Christina Klotz oder Jaqueline Schneider kultiviert und ausplattiert.

6.1.2 Lösungsmittel und Materialien für die Chromatographie

DMF und Acetonitril für die Umkehrphasenchromatographie wurden von VWR Chemicals in einer Reinheit von 99.9% erworben. Essigsäure wurde von FISHER CHEMICALS und Triethylamin wurde von CARL ROTH erworben. TEAA-Puffer (2 M) für die HPLC-Aufreinigung von Oligonukleotiden wurde hergestellt, indem Essigsäure (114 mL) und Triethylamin (278 mL) in H₂O (608 mL) gelöst und über Nacht gerührt wurde. Anschließend wurde der pH-Wert auf 7.3 eingestellt. Vor der HPLC-Aufreinigung wurde der TEAA-Puffer auf 0.1 M mit H₂O verdünnt und der pH-Wert nachjustiert. H₂O für die analytische und präperative HPLC und die UHPLC-MS wurde aus der Reinstwasser-Aufbereitungsanlage von ASTACUSLIFESCIENCE von MEMBRAPURE verwendet.

6.1.3 Dünnschichtchromatographie

Reaktionsverläufe wurden über Dünnschichtchromatographie auf Silikagel-beschichteten Dünnschichtplatten (Schichtdicke: 0.2 mm) des Typs 60-F₂₅₄S von MERCK verfolgt. Die Detektion erfolgte entweder bei einer UV-Anregung bei 254 nm oder durch anfärben mit Ninhydrin-Lösung (300 mg in 100 mL Butanol, 3 ml Essigsäure) oder Permanganat-Lösung (0.05% KMnO₄ in wässriger Lösung).

6.1.4 Säulenchromatographie

Säulenchromatographische Aufreinigungen wurden unter der Verwendung von Druckluft an Kieselgel 60 von MERCK (Korngröße 0.032-0.063 mm) durchgeführt.

6.1.5 Oligonukleotide

Alle fluoreszent markierten und nicht modifizierten Oligonukleotide wurden von der Firma BIOMERS kommerziell erworben. Alle Oligonukleotide wurden HPLC-aufgereinigt bestellt und die Konzentrationen mittels UV-vis-Spektroskopie, sowohl dieser Oligonukleotide, als auch der selbstsynthetisierten, in Wasser quantifiziert. Die entsprechenden Extinktionskoeffizienten wurden mit Hilfe des Oligoanalyzers 3.1 von IDT berechnet. Bei Fluoreszenz-markierten Oligonukleotiden wurden die Extinktionswerte der Farbstoffe bei 260 nm zum Extinktionswert der Sequenz hinzuaddiert: $\epsilon_{\text{Cy3}} = 4.93 \text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{cm})$, $\epsilon_{\text{Cy5}} = 10.00 \text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{cm})$, $\epsilon_{\text{RhB}} = 2.80 \text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{cm})$.

6.1.6 Materialien für Biochemische Arbeiten

Materialien für die native Gelelektrophorese wurde von den Firmen CARL ROTH (RothphoreseGel 40®), SIGMA ALDRICH (Ammoniumpersulfat, Glycerol), ACROS ORGANICS (TEMED) und THERMOFISCHER (SybrGold, ultra low range DNA-ladder) kommerziell erworben. Zell-Lysat-Puffer wurde von CELLSIGNAL erstanden.

Der Vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (VEGF) wurde von SIGMA ALDRICH erhalten. Dieser wurde nach der Lieferung sofort aliquotiert und bei -20 °C aufbewahrt. BCA-Assays wurden mit einem Kit von THERMO FISCHER durchgeführt und die ELISA-Assays mit einem Kit von CELLSIGNAL.

6.1.7 PUFFER

Puffer	Anwendung	Zusammensetzung
HEPES-Puffer I	Bindungsaffinitäten	10 mM HEPES, 1 mM MgCl ₂ , pH 7.5
HEPES-Puffer II	Bindungsaffinitäten	10 mM HEPES, 5 mM MgCl ₂ , pH 7.5
HEPES-Puffer II	Bindungsaffinitäten	10 mM HEPES, 10 mM MgCl ₂ , pH 7.5
HEPES-Puffer IV	Bindungsaffinitäten	10 mM HEPES, 100 mM MgCl ₂ , pH 7.5
Phosphatpuffer I	Bindungsaffinitäten	10 mM NaH ₂ PO ₄ , 1 mM MgCl ₂ , pH 7.5
Phosphatpuffer II	Bindungsaffinitäten	10 mM NaH ₂ PO ₄ , 5 mM MgCl ₂ , pH 7.5
Phosphatpuffer III	Bindungsaffinitäten	10 mM NaH ₂ PO ₄ , 10 mM MgCl ₂ , pH 7.0
Phosphatpuffer IV	Bindungsaffinitäten	10 mM NaH ₂ PO ₄ , 10 mM MgCl ₂ , 0.5% BSA, pH 7.5
Phosphatpuffer V	Maleinimid-Thiol-Kupplung	100 mM NaH ₂ PO ₄ , pH 6.5
Tris-Puffer	CuAAC	10 mM Tris, 10 mM NaH ₂ PO ₄ , 5 mM MgCl ₂ , pH 8
TB-Puffer	Native Gelelektrophorese	89 mM Tris, 89 mM H ₃ BO ₃ , 1 mM MgCl ₂ , 150 mM NaCl
Ladepuffer	Beladung Native Gele	4% 5x-TB-Puffer, 50% Glycerol
Blockierungspuffer I	Blockierung von well-Platten	0.2% BSA, 0.1 mg/mL Sperm-DNA in HANKS BALANCED DILUTION
Blockierungspuffer II	Blockierung von well-Platten	0.5% BSA, 0.1 mg/mL Lachs-Sperma-DNA in HANKS BALANCED DILUTION
Lysepuffer	Lysieren von Zellen	1 mM PMSF in Isopropanol in Lysepuffer von CELL SIGNAL

6.2 Geräte

DNA-Synthese

Automatisierte DNA-Festphasensynthese wurde an einem MERMADE 4 DNA-SYNTHESIZER (Bioautomation Corporation) in 1 μ mol Säulen für die DNA-Synthese (SIGMA ALDRICH) durchgeführt.

Peptid- und Peptoid-Synthese

Manuelle Peptid und Peptoid-Synthese wurde in 2 mL Polyethylen Spritzenreaktoren (von MultSynTech) mit einem Filter durchgeführt.

Präperative und analytische HPLC

Semi-präperative und analytische HPLC der modifizierten DNA wurde an einem 1105 HPLC System von Gilson durchgeführt. Für die semi-präperative Aufreinigung wurde die Säule X-Bridge BEH 130 C18 (10x150mm, 5 μ M) mit einer Flussrate von 8 mL/min bei 55 °C verwendet. Für die analytischen Läufe wurde eine Waters X-Bridge BEH 130 C18 (4.6x250mm, 5 μ m) bei einer Flussrate von 1.5 mL/min bei 55 °C verwendet. Als mobile Phasen wurde ein binäres Gemisch aus A (0.1 M TEAA Puffer, pH 7.3, aq.) und B (Acetonitril) verwendet.

Semi-präperative HPLC der Peptide und Peptoide wurde an einem AGILENT 1100 SERIES INSTRUMENT durchgeführt. Die Absorbanz wurde durch einen photo diode array Detektor bei 210 nm gemessen und eine Säule von Machery & Nagel (250x21 mm, 5 μ) verwendet. Die Proben wurden mit einem Lösungsmittelgemisch aus A (98.9% Wasser, 1% Acetonitril und 0.1% TFA) und B (98.9% Acetonitril, 1% Wasser und 0.1% TFA) bei einer Flussrate von 15 mL/min eluiert.

Analytische HPLC der Peptide und Peptoide erfolgte über UHPLC-MS an der ACQUITY von WATERS. Massenspektroskopie erfolgte durch einen Quadrupol-Analysator mit Elektronenspray-Ionisation (ESI). Die Detektion erfolgte über einen DAD-Detektor bei

den Wellenlängen 210 nm und 260 nm. Es wurde eine Säule des Typs Acquity UPLC C18-Trennsäule (1.7 μ M, 50 x 2.1 mm) von WATERS bei einer Temperatur von 55 °C verwendet. Die Proben wurden mit einem Lösungsmittelgemisch aus A (98.9% Wasser, 1% Acetonitril und 0.1% TFA) und B (98.9% Acetonitril, 1% Wasser und 0.1% TFA) bei einer Flussrate von 0.5 mL/min eluiert.

MALDI-TOF

MALDI-TOF Massenspektrometrie wurde an einem SHIMADZU AXIMA CONFIDENCE im positiven Modus durchgeführt. Als Anregungsquelle wurde ein Stickstofflaser benutzt $\lambda = 337$ nm. Als Matrices wurden entweder HPA (0.15 M 2,3,4-Trihydroxyacetophenon in Wasser/Ethanol (1:1 [v/ v]) mit 0.5 M Diammoniumcitrat) oder THAP (1:1 Gemisch aus 50 mg/mL 2,4,6-hydroxyacetophenon in MeCN/H₂O und 50 mg/mL Diammoniumcitrat in MeCN/H₂O, 1:1) benutzt.

Kernmagnetische Resonanzspektroskopie

Die ¹H-, ¹³C- und ³¹P-Spektren wurden an den Geräten BRUKER AVANCE II 300 oder BRUKER AVANCE II 500 aufgenommen. Die Auswertung erfolgte mit der Software MESTREC 4.8.6.0.

UV/VIS-SPEKTROMETER

Denaturierungsexperimente wurden entweder an einem CAREY 100 BIO-Absorptionsspektrometer (VARIAN) oder an einem JASCO V-750 SPECTROPHOTOMETER (JASCO) durchgeführt. Die Lösungen der Oligonukleotide wurden hierfür in 1 mL Quarzglasküvetten mit Deckel der Firma HELIMA überführt. Vor den Messungen wurden die Küvetten mit einer 1%igen HELLMANEX III-Lösung über 4 h gereinigt und anschließend mit Methanol oder Wasser gespült.

Fluoreszenz-Spektrometer

Affinitätsmessungen wurden zum Teil an einem Fluoreszenz-Spektrometer des Typs CAREY ECLIPSE von VARIAN durchgeführt. Die Messlösungen wurden für die Messungen in Quarzglasküvetten Firma HELLVA überführt (Schichtdicke: 1 cm oder 0.1 cm, Volumen: 1 mL oder 100 μ L). Vor den Messungen wurden die Küvetten mit einer 1%igen HELLMANEX III-Lösung über 4 h gereinigt und anschließend mit Methanol oder Wasser gespült. Für Rhodamin B wurde eine Anregungswellenlänge von 550 nm verwendet bei einer Schlitzbreite von 5 mm. Für Pyronin B wurde eine Anregungswellenlänge von 525 nm verwendet bei einer Schlitzbreite von 5 mm. Die Messungen wurden bei einer konstanten Temperatur von 25 °C durchgeführt und die Spektren mit einer Messzeit von 1 s aufgenommen.

Fluoreszenzmessungen am Plattenlesegerät

Affinitätsmessungen, die nicht am Fluoreszenz-Spektrometer durchgeführt worden sind, wurden an einem VICTOR X5 MULTIMODE PLATE-READER von PERKIN ELMER ausgeführt. Die Proben wurden entweder in Optiplate 96F-Wellplatten oder in Optiplate 384F-Wellplatten pipettiert und die Fluoreszenz wurde von oben gemessen. Die Anregungsdauer betrug 1 s und es wurde bei 25 °C gemessen. Für die Fluorophore wurden die folgenden Filter gewählt:

Pyronin B λ_{ex} 480 nm λ_{em} 540 nm

Rhodamin B λ_{ex} 531 nm λ_{em} 590 nm

Cy3 λ_{ex} 531 nm λ_{em} 590 nm

Absorptionsmessungen am Plattenlesegerät

Die Absorptionsmessungen für den ELISA-Assay wurden am VICTOR X5 MULTIMODE PLATE-READER von PERKIN ELMER ausgeführt. Dafür wurden ein Filter mit einer Absorptionswellenlänge von 480 nm verwendet. Die Anregungsdauer betrug 1 s und es wurde bei 25 °C gemessen.

Für den BCA-Assay wurde ein Plattenlesegerät des Typs POLARSTAR OPTIMA von BMG LABTECH verwendet. Hierfür wurden 96-well Platten von TPP verwendet und die Messungen wurden bei 25 °C und bei einer Wellenlänge von 580 nm durchgeführt.

Fmoc-monitoring am Absorptionsspektrometer

Für die Evaluierung der Ausbeuten der Aminosäurekupplungen wurde der Fmoc-Wert bestimmt. Die Absorptionswerte wurden an einem VARIAN CAREY 100 BIO (AGILENT TECHNOLOGIES) durchgeführt. Hierfür wurde ein Aliquot des Filtrats der Fmoc-Abspaltung herausgenommen, verdünnt und der Absorptionswert bei 301 nm gemessen. Die Beladung wurde anschließend durch das Lambert-Beer'sche Gesetz ($A = \epsilon_{301} \times c \times d$) berechnet.

Konzentrationsbestimmung der Oligonukleotide mit einem Nanodrop

Die Konzentrationen der DNA-Stocklösungen wurden an einem Nanodrop ND-1000 SPECTROPHOTOMETER (PEQLAB BIOTECHNOLOGIE GMBH) gemessen. Die Konzentration wurde anhand der optischen Dichte bei 260 nm durch das Lambert-Beer'sche Gesetz ($A = \epsilon_{260} \times c \times d$) bestimmt. Die Extinktionskoeffizienten wurden durch den OLIGOANALYZER 3.1 von INTEGRATED DNA TECHNOLOGIES (IDT) berechnet.

Bildgebung von Gelen

Gele wurden an einer IMAGE STATION MM PRO von KODAK visualisiert.

Fluoreszenzmikroskopie

Für die Visualisierung der Bindung der bispezifischen Binder wurden Fluoreszenzmikroskopiebilder an einem Inversmikroskop IX83 von OLYMPUS mit der Anregung durch eine COOLED PE-4000 Einheit und der Kamera ORCA-FLASH 4.0 von HAMAMATSU aufgenommen. Die Messungen wurden bei einer 60fachen Vergrößerung durchgeführt. Dafür wurde das IMMOIL-F30CC verwendet. Die Zellen wurden in 8-WELL μ -SLIDES mit der I-

6.2 Geräte

BiTREAT® (Beschichtung von IBIDI) ausplattiert und für die Mikroskopie verwendet. Die Aufnahmen erfolgten mit der SOFTWARE CELLSense DIMENSION von Olympus. Für die Messungen wurde ein TRITC-Filter genutzt ($\lambda_{\text{ex}} = 575 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 593 \text{ nm}$, Belichtungsdauer: 3-5 s).

6.3 Allgemeine Arbeitsvorschriften

6.3.1 Synthese des β -Cyclodextrin-Maleinimids

Die Synthese des β -Cyclodextrin-Maleinimids wurde, wie in der Bachelorarbeit von Hoa Le Xuan aus dem Arbeitskreis Seitz beschrieben, durchgeführt. Das dazu benötigte Maleinimid **4** wurde von Viktor Bandlow aus dem Arbeitskreis Seitz hergestellt.

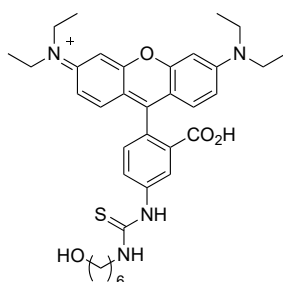
6.3.2 Synthese des Azido-modifizierten Cucurbit[7]urils

Die Synthese des Azido-modifizierten CB[7] **19** wurde wie in der Literatur beschrieben durchgeführt.^{92, 95, 97, 177}

6.3.3 Synthese von 2-Cyanoethyl-1-hexanthiotrityl-*N,N*-diidopropylphosphoramidit **9**

Dies Synthese von 2-Cyanoethyl-1-hexanthiotrityl-*N,N*-diidopropylphosphoramidit **9** wurde wie in der Bachelorarbeit von Hoa Le Xuan beschrieben, durchgeführt.

6.3.4 Synthese vom Linker modifizierten Rhodamin B (**23**)



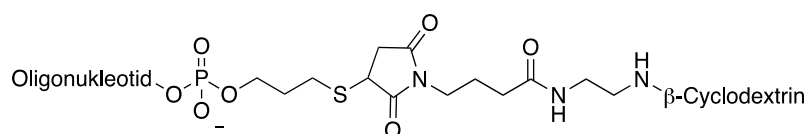
6-Amino-1-Hexanol **21** (13.1 mg, 112 μ mol, 2.00 eq) wurde in trockenem THF (2 mL) unter Argonatmosphäre gelöst. Anschließend wurde Rhodamin B-Isothiocyanat **22** (30.0 mg, 56 μ mol, 1.00 eq) in trockenem THF (2 mL) tropfenweise zugegeben und die Reaktion bei Raumtemperatur 3 h gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch (Dichlorme-

than/Methanol, 9:1) aufgereinigt. Auf der Säule wurde eine Zersetzung des Produkts beobachtet. Es konnte allerdings eine reine Fraktion gewonnen werden. Die Analyse der Reinheit erfolgte mit UHPLC-MS (0-50% ACN in 6 min, R_T : 3.1 min).

6.3.5 Experimentelle Vorschrift für die DNA-Synthese

Die automatisierte Oligonukleotidsynthese wurde mittels der Phosphoramiditmethode an einem MERMADE4 SYNTHESIZER (BIOAUTOMATION) im 1 μ mol Maßstab unter Argonatmosphäre durchgeführt. Als feste Phase wurde CONTROLLED POROUS GLASS (CPG) verwendet. Dieses war entweder mit den entsprechenden Basen (dA^{Bz} , dC^{Bz} , dT oder dG^{Dmf}) oder mit einem Alkin modifiziert. Die Konzentrationen aller eingesetzten Phosphoramidite betrug 0.1 M und die Kupplungszeit betrug 60 s. Alle Kupplungen wurden doppelt durchgeführt. Ein Tag vor der Synthese wurden die Phosphoramidite auf RT gebracht und in trockenem Acetonitril gelöst. Direkt vor der Synthese wurde das Harz auf RT gebracht, abgewogen, in die Säulen überführt und die Synthese anschließend gestartet. Während der DNA-Synthese wurde der Verlauf mit Hilfe eines Trityl-Monitorings verfolgt. Alle Oligonukleotide wurden „DMT-on“ synthetisiert. Das bedeutet, dass die letzte DMT-Schutzgruppe am 5'-Ende nicht abgespalten wurde, um eine leichtere Aufreinigung zu gewährleisten. Nach der Synthese wurde das Harz im Vakuum getrocknet und bis zur Abspaltung bei 4 °C aufbewahrt.

6.3.6 Synthese der β -Cyclodextrin modifizierten DNA



Für die Synthese der β -Cyclodextrin modifizierten DNA wurde zunächst die Oligonukleotidsequenz automatisiert an der festen Phase aufgebaut. An das 5'-Ende wurde der C6-Thiolmodifizier angebracht. Nach der automatisierten Festphasensynthese wurde das CPG 30 min im Vakuum getrocknet und in 2 mL Sarstedt-Gefäße überführt. Zur Abspaltung wurde das CPG mit konzentrierter Ammoniak-Lösung (1 mL, 33% in H_2O) versetzt und 4 Stunden bei 55 °C geschüttelt und anschließend abgekühlt. Der Ammoniak wurde mit-

tels SpeedVac (ca. 30 min) und das Harz mittels Spritzenfilter entfernt. Die Lösung wurde mit Wasser auf 1 mL verdünnt und mittels HPLC gereinigt (20-45 in 15 min, Säule 2, binäres Lösungsmittelgemisch: A: TEAA, wässrig, pH = 7.3 und B: Acetonitril, 8 mL/min).

Die Produktfraktionen wurden in 15 mL Falkontubes vereinigt und mittels Gefriertrocknung vom Lösungsmittel befreit. Anschließend wurde die DNA drei Mal durch Fällung mit Isopropanol und Ammoniumacetat entsalzt.

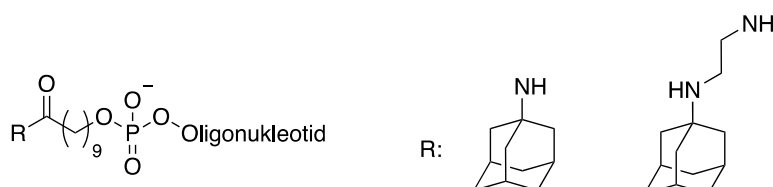
Zur Abspaltung der Tritylschutzgruppe wurde die DNA in TEAA (0.1M, pH = 7.3, 100 μ L pro 50 nmol) gelöst, AgNO₃ (0.1 M, 10 eq. 5 μ L pro 50 nmol) zugegeben, gemischt und eine Stunde reagieren lassen. Anschließend wurde DTT (0.1 M, 5 eq., 7.5 μ L pro 50 nmol) zugegeben, gemischt und 30 min inkubiert.

Zur Aufreinigung wurden NAP-Säulen verwendet und das Lösungsmittel mittels Gefriertrocknung entfernt. Bis zur Maleinimid-Thiol-Kupplung wurde die DNA im Kühlschrank bei 4 °C aufbewahrt.

Für die Maleinimid-Thiol-Kupplung wurde die DNA im Ligationspuffer (10 mM NaH₂PO₄, pH = 6.5, 750 μ M DNA) gelöst und das Maleinimid (2 eq.) zugegeben. Die Reaktionslösung wurde 4 h bei Raumtemperatur geschüttelt und die Cyclodextrin-modifizierte DNA mittels HPLC (0-25 in 15 min, Säule 2, binäres Lösungsmittelgemisch: A: TEAA, wässrig, pH = 7.3 und B: Acetonitril, 8 mL/min) gereinigt. Die DNA wurde anschließend mittels Gefriertrocknung vom Lösungsmittel befreit und drei Mal durch Fällung mit Isopropanol und Ammoniumacetat entsalzt. Die Reinheit der DNA wurde mittels MALDI (HPA-Matrix) und analytischer HPLC (0-50% ACN in 15 min) überprüft.

Die DNA wurde bis zur Verwendung bei -20 °C aufbewahrt.

6.3.7 Synthese der Adamantyl-modifizierten DNA



Für die Synthese der Adamantyl-modifizierten DNA wurde zunächst die Oligonukleotidsequenz automatisiert an fester Phase aufgebaut. An das 5'-Ende der DNA wurde ein C-10-Carboxymodifier gekuppelt.

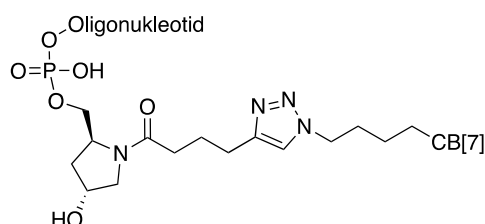
Nach der Festphasensynthese wurde das Harz 30 min unter Vakuum getrocknet und in einen Spritzenreaktor überführt. Anschließend wurde das Harz mit einer Lösung aus Adamantanamin (5 mg, 31.5 mM) oder Adamantanethylendiamin (5.1 mg, 31.5 mM) und DIPEA (50 μ L, 500 mM) in trockenem DMSO (1 mL) versetzt, die Lösung 10 Mal durch die Spritze gezogen und das Harz für eine Stunde in der Lösung inkubiert. Dies wurde zwei Mal wiederholt und anschließend das Harz 16 h lang in der Lösung inkubiert.

Das Harz wurde 10 Mal mit Acetonitril gewaschen, 30 min unter Vakuum getrocknet und in 2 mL Sarstedt-Gefäße überführt. Zur Abspaltung wurde das CPG mit konzentrierter Ammoniak-Lösung (1 mL) versetzt, 4 Stunden bei 55 °C geschüttelt und anschließend abgekühlt. Der Ammoniak wurde mittels SpeedVac (ca. 30 min) und das Harz mittels Spritzenfilter entfernt. Die Lösung wurde mit Wasser auf 1 mL verdünnt und mittels HPLC gereinigt (0-50 in 30 min, Säule 2, binäres Lösungsmittelgemisch: A: TEAA, wässrig, pH = 7.3 und B: Acetonitril, 8 mL/min).

Die Produktfraktionen wurden in 15 mL Falkontubes vereinigt und mittels Gefriertrocknung vom Lösungsmittel befreit. Anschließend wurde die DNA drei Mal durch Fällung mit Isopropanol und Ammoniumacetat entsalzt. Die Reinheit der DNA wurde mittels MALDI (HPA-Matrix) und analytischer HPLC (0-50% ACN in 15 min) überprüft.

Die DNA wurde bis zur Verwendung bei -20 °C aufbewahrt.

6.3.8 Synthese der CB[7]-modifizierten DNA



Für die CB[7]-modifizierte DNA wurde ein alkinmodifiziertes Harz verwendet. Nach der automatisierten Festphasensynthese wurde das CPG 30 min im Vakuum getrocknet und in 2 mL Sarstedt-Gefäße überführt. Zur Abspaltung wurde das CPG mit konzentrierter Ammoniak-Lösung (1 mL) versetzt, 4 Stunden bei 55 °C geschüttelt und anschließend abgekühlt. Der Ammoniak wurde mittels SpeedVac (ca. 30 min) und das Harz mittels Spritzenfilter entfernt. Die Lösung wurde mit Wasser auf 1 mL verdünnt und mittels HPLC gereinigt (20-50 in 12 min, semipräparativ, binäres Lösungsmittelgemisch: A: TEAA, wässrig, pH = 7.3 und B: Acetonitril, 8 mL/min).

Die Produktfraktionen wurden in 15 mL Falkontubes vereinigt und mittels Gefriertrocknung vom Lösungsmittel befreit. Anschließend wurde die DNA drei Mal durch Fällung mit Isopropanol und Ammoniumacetat entsalzt.

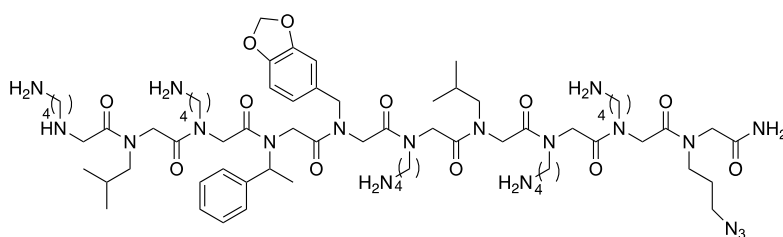
Nach der Trocknung mittels Speed-Vac (30 min) wurde die DMT-Schutzgruppe entfernt. Dafür wurde zur DNA 70%ige Essigsäure (300 µL) gegeben und für 45 min geschüttelt. Anschließend wurde die DNA drei Mal durch Fällung mit Isopropanol und Ammoniumacetat entsalzt.

Zu der alkinmodifizierten DNA (200 nmol, 1.00 eq) in PUS-Puffer (100 mM Tris, 100 mM NaOAc, 1 mM MgCl₂, pH 8, 200 µL) wurde zunächst Natrium-*L*-ascorbat (3.96 mg, 20.0 µmol, 100 eq) und THPTA (4.78 mg, 11 µmol, 55.0 eq) in PUS-Puffer (300 µL) zugegeben. Anschließend wurde das azidmodifizierte CB[7] (5.07 mg, 4.00 µmol, 20.0 eq) in PUS-Puffer (500 µL) und eine Cu(II)-Sulfat-Lösung (150 mM,

15 μL) in PUS-Puffer zugegeben. Das Sarstedt-Tube wurde mit Argon versetzt und 4 h bei 55 °C geschüttelt. Danach wurde eine Spatelspitze Natriumhydrogensulfid Hydrat zugegeben und weitere 10 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Die Suspension wurde durch einen Spritzenfilter filtriert und mittels HPLC (0-30 in 30 min, semipräparativ, binäres Lösungsmittelgemisch: A: TEAA, wässrig, pH = 7.3 und B: Acetonitril, 8 mL/min) aufgereinigt. Die vereinigten Fraktionen wurden in 15 mL Falcontubes vereinigt, gefriergetrocknet und drei Mal durch Fällung mit Isopropanol und Ammoniumacetat entsalzt. Trocknung der DNA mittels SpeedVac lieferte die CB[7]-modifizierte DNA in guten Ausbeuten. Die Reinheit der DNA wurde mittels MALDI (THAP-Matrix) und analytischer HPLC (0-50% ACN in 15 min) überprüft.

Die DNA wurde bis zur Verwendung bei -20 °C aufbewahrt.

6.3.9 Synthese des Peptoids 1



Für die Synthese des Peptoids 1 wurde ein Rinkamid-Tentagel-Harz verwendet (Beladung: 0.2 mmol/g, Ansatz: 10 μmol , 50 mg). Dieses wurde in einen Spritzenreaktor (2 mL) überführt und zunächst in DMF (2 mL) für 15 min gequollen. Anschließend wurde das DMF entfernt, eine Lösung aus Piperidin in DMF (20%, 500 μL) zugegeben, 2 min geschüttelt und die Lösung wieder aus dem Spritzenreaktor entfernt. Der Vorgang wurde für 12 min wiederholt und das Harz mit DMF (5 x 1 min, 1 mL) gewaschen.

Für die Bromacetylierung wurde Bromessigsäure (14.0 mg, 100 μmol , 10.0 eq) und DIC (14.3 μL , 93.0 μmol , 9.3 eq) in DMF (167 μL) gelöst, zum Harz gegeben und der Spritzenreaktor für 30 min geschüttelt. Anschließend wurde die Lösung aus der Spritze gedrückt und das Harz mit DMF (5 x 1 min, 1 mL) gewaschen.

Für die Bromsubstitution wurde das entsprechende Amin (300 μmol , 30.0 eq) in NMP (1.5 M, 200 μL) gelöst, zum Harz gegeben und 60 min geschüttelt. Anschließend wurde das Harz mit DMF (5 x 1min, 1 mL) gewaschen und die Bromacetylierung und Bromsubstitution so lange wiederholt, bis die gewünschte Länge der Peptoids erreicht war.

Zur Abspaltung vom Harz wurde zum Harz eine Lösung aus TFA/ H_2O /TIS (96:2:2, 2 mL) gegeben und für 2 h geschüttelt. Anschließend wurde die Lösung in ein 15 mL Falcontube überführt und das Harz mit TFA nachgewaschen (3 x 1 mL). Die kombinierten TFA-Lösungen wurden auf 500 μL mit einem Luftstrom eingengt und kalter Diethylether (13 mL) zugegeben. Anschließend wurde das ausgefallene Peptoid zentrifugiert (20 min, 4200 rpm).

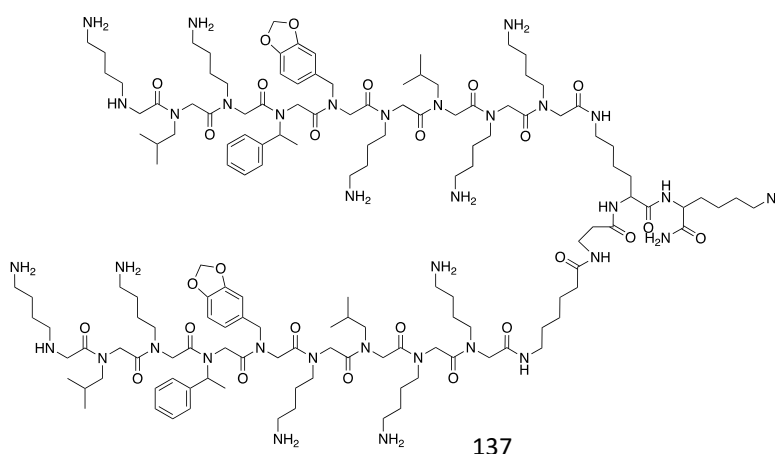
Die Lösung wurde abdekantiert und das Pellet in Acetonitril/ H_2O gelöst (3:5, 800 μL).

Danach erfolgte die Aufreinigung mittels HPLC (3-80 in 30 min, semipräparativ, binäres Lösungsmittelgemisch: A: H_2O /Acetonitril/TFA 98.9:1:0.1 B: Acetonitril/ H_2O /TFA 98.9:1:0.1, 15 mL/min). Die gesammelten Fraktionen wurden mittels UHPLC-MS untersucht (3-80 in 4 min, analytisch, binäres Lösungsmittelgemisch: A: H_2O /Acetonitril/TFA 98.9:1:0.1 B: Acetonitril/ H_2O /TFA 98.9:1:0.1, 15 mL/min), die reinen Fraktionen in 15 mL Falcontubes vereinigt und gefriergetrocknet.

Bis zur Kupplung an DNA, wurde das Peptoid bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ aufbewahrt.

Peptoid 1 wurde als weißer Feststoff in guter Ausbeute (8.9 mg, 6.49 μmol , 65%) erhalten.

6.3.10 Synthese des Peptoids 2



Für die Synthese des Peptoids 2 wurde ein Rinkamid-Tentagel-Harz verwendet (Beladung: 0.2 mmol/g, Ansatz: 10 μ mol, 50 mg). Dieses wurde in einen Spritzenreaktor (2 mL) überführt und zunächst in DMF (2 mL) für 15 min gequollen. Anschließend wurde das DMF entfernt, eine Lösung aus Piperidin in DMF (20%, 500 μ L) zugegeben, 2 min geschüttelt und die Lösung wieder aus dem Spritzenreaktor entfernt. Der Vorgang wurde für 12 min wiederholt und das Harz mit DMF (5 x 1 min, 1 mL) gewaschen.

Zur Kupplung der ersten Aminosäure wurde Fmoc-Lys(N₃)-OH (158 mg, 40.0 μ mol, 4.00 eq), TBTU (11.6 mg, 36.0 μ mol, 3.60 eq) und HOBt (5.4 mg, 40.0 μ mol, 4.00 eq) in DMF (133 μ L) gelöst, DIPEA (13.6 μ L, 80.0 μ mol, 8.00 eq) dazugegeben und gemischt. Anschließend wurde die Lösung auf das Harz gegeben und 30 min inkubiert. Danach wurde die Lösung aus der Spritze gedrückt, mit DMF (3 x 1 min, 1 mL) gewaschen und der Vorgang noch einmal wiederholt.

Zum Cappen der nicht reagierten Stellen wurde zum Harz eine Lösung aus DMF/1,6-Lutidine/Ac₂O (89:6:5, 1 mL) zugegeben, 5 min geschüttelt und das Harz anschließend mit DMF (3 x 1 min, 1 mL) gewaschen. Anschließend wurde der Vorgang noch einmal wiederholt.

Zur Abspaltung der Fmoc-Gruppe wurde zum Harz eine Lösung aus Piperidin/DMF (20%, 500 μ L) gegeben und 3 min geschüttelt. Dieser Vorgang wurde noch einmal wiederholt und das Harz anschließend mit DMF (5 x 1 min, 1 mL) gewaschen.

Wie oben beschrieben wurden anschließend die Aminosäuren Fmoc-Lys(Mtt)-OH, Fmoc- β -Ala-OH, Fmoc-Ahx-OH gekuppelt.

Nach den Kupplungen und der Fmoc-Abspaltung, wurde das Harz mit DCM (10 x 1 min, 1 mL) gewaschen. Anschließend wurde zum Harz zur Mtt-Abspaltung eine Lösung aus DCM/TIS/TFA (91:5:4, 1 mL) gegeben und 2 min geschüttelt. Dieser Vorgang wurde noch vier Mal wiederholt, bis sich die Lösung nicht mehr rot färbte und das Harz mit DMF (10 x 1 min, 1 mL) gewaschen.

Für die Bromacetylierung wurde Bromessigsäure (28.0 mg, 200 μ mol, 20.0 eq) und DIC (28.6 μ L, 186 μ mol, 18.6 eq) in DMF (333 μ L) gelöst, zum Harz gegeben und der Sprit-

zenreaktor für 30 min geschüttelt. Anschließend wurde die Lösung aus der Spritze gedrückt und das Harz mit DMF (5 x 1 min, 1 mL) gewaschen.

Für die Bromsubstitution wurde das entsprechende Amin (600 μmol , 60.0 eq) in NMP (1.5 M, 400 μL) gelöst, zum Harz gegeben und 60 min geschüttelt. Anschließend wurde das Harz mit DMF (5 x 1min, 1 mL) gewaschen und die Bromacetylierung und Bromsubstitution so lange wiederholt, bis die gewünschte Länge des Peptoids erreicht war.

Zur Abspaltung vom Harz wurde zum Harz eine Lösung aus TFA/H₂O/TIS (96:2:2, 2 mL) gegeben und für 2 h geschüttelt. Anschließend wurde die Lösung in ein 15 mL Falcontube überführt und das Harz mit TFA nachgewaschen (3 x 1 mL). Die kombinierten TFA-Lösungen wurden auf 500 μL mit einem Luftstrom eingengt und kalter Diethylether (13 mL) zugegeben. Anschließend wurde das ausgefallene Peptoid zentrifugiert (20 min, 4200 rpm).

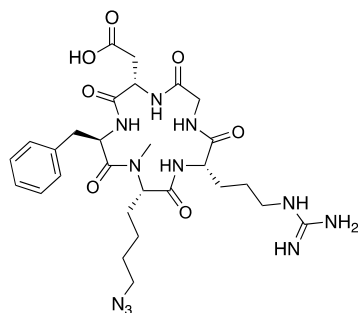
Die Lösung wurde abdekantiert und das Pellet in Acetonitril/H₂O gelöst (3:5, 800 μL).

Danach erfolgte die Aufreinigung mittels HPLC (3-80 in 30 min, semipräparativ, binäres Lösungsmittelgemisch: A: H₂O/Acetonitril/TFA 98.9:1:0.1 B: Acetonitril/H₂O/TFA 98.9:1:0.1, 15 mL/min). Die gesammelten Fraktionen wurden mittels UHPLC-MS untersucht (3-80 in 4 min, analytisch, binäres Lösungsmittelgemisch: A: H₂O/Acetonitril/TFA 98.9:1:0.1 B: Acetonitril/H₂O/TFA 98.9:1:0.1, 15 mL/min), die reinen Fraktionen in 15 mL Falcontubes vereinigt und gefriergetrocknet.

Bis zur Kupplung an DNA wurde das Peptoid bei -20 °C aufbewahrt.

Das Peptoid 2 wurde als weißer Feststoff (7.00 mg, 2.39 μmol , 24%) erhalten.

6.3.11 Synthese des Cilengitids



Für die Synthese des Cilengitids wurde ein Chlortritylchlorid Harz verwendet (Beladung: 1 mmol/g). Das Harz (40 mg) wurde vor der Beladung 30 min im Hochvakuum getrocknet und in einen 2 mL Spritzenreaktor überführt. Für die Erstbeladung wurde Fmoc-Gly-OH (35.6 mg, 120 μ mol, 1.2 eq) abgewogen und in trockenem Dichlormethan (1 mL) gelöst. Anschließend wurde DIPEA (24.4 mL, 250 μ mol, 2.5 eq) zugegeben, gemischt, auf das Harz gegeben und 2 h geschüttelt. Anschließend wurde zu der Lösung 200 μ L Methanol gegeben und weitere 15 min geschüttelt. Die Lösung wurde vom Harz entfernt und das Harz mit Dichlormethan (5 x 1 min, 2 mL), Dichlormethan/Methanol (1:1, 5 x 1 min, 2 mL), Methanol (2 x 1 min, 2 mL) und danach mit DMF (10 x 1 min, 1 mL) gewaschen. Zur Fmoc-Abspaltung wurde zum Harz Piperidin in DMF (20%, 500 μ L) gegeben und 5 min geschüttelt. Anschließend wurde das Harz abermals mit Piperidin in DMF (20%, 500 μ L) für 15 min behandelt. Anschließend wurde das Harz mit DMF (5 x 1 min, 1 mL) gewaschen.

Um die Beladung des Harzes zu bestimmen wurde die Absorption der Piperidin-Lösung in DMF bei 301 nm bestimmt.

Anschließend erfolgte die Kupplung von Fmoc-Arg(Pbf)-OH. Hierfür wurde die Aminosäure (259.2 mg, 400 μ mol, 4.0 eq), TBTU (115.6 mg, 360 μ mol, 3.6 eq) und HOBt (54.0 mg, 400 μ mol, 4 eq) in DMF (1.3 mL) gelöst, auf das Harz gegeben und 30 min geschüttelt. Nach der Kupplung wurde das Harz mit DMF (3 x 1 min, 1 mL) gewaschen und der Vorgang nochmals wiederholt. Zum Cappen der nicht reagierten Stellen wurde eine Lösung aus DMF/1,6-Lutidine/ Ac_2O (89:6:5, 1 mL) zum Harz gegeben und 5 min geschüttelt. Das Harz wurde mit DMF (3 x 1 min, 1 mL) gewaschen und der Vorgang nochmal wiederholt. Die Fmoc-Abspaltung wurde wie bereits beschrieben durchgeführt, allerdings die Dauer der Abspaltung auf 2 min verkürzt.

Anschließend erfolgte die Kupplung von Fmoc-Lys(N₃)-OH, wie bereits beschrieben.

Für die Methylierung wurde das Amin zunächst mit *o*-NBS-Cl geschützt. Hierfür wurde *o*-NBS-Chlorid (88.4 mg, 400 µmol, 4.00 eq) in DMF (1 mL) gelöst, *sym*-Collidin (133 µL, 500 µmol, 10.0 eq) zur Lösung zugegeben, auf das Harz gegeben und 15 min geschüttelt. Anschließend wurde das Harz mit DMF (1 x 1 min, 1 mL) gewaschen und der Vorgang mit einer Reaktionszeit von 10 min wiederholt. Zum Schluss wurde nochmals mit DMF (1 x 1 min, 1 mL) gewaschen.

Zur Methylierung wurde DBU (45.0 µL, 300 µmol, 3.00 eq) in DMF (1.0 mL) gelöst, auf das Harz gegeben und 3 min geschüttelt. Anschließend wurde Dimethylsulfat (94.8 µL, 1.0 mmol, 10.0 eq) in DMF (1.0 mL) gelöst, zur Lösung gegeben und weitere 2 min geschüttelt. Der Vorgang wurde daraufhin noch einmal wiederholt und das Harz anschließend mit DMF (5 x 1 min, 1 mL) gewaschen.

Zur *o*-NBS-Entschützung wurde 2-Mercaptoethanol (70.0 µL, 1.0 mmol, 10.0 eq) und DBU (75 µL, 500 µmol, 5.00 eq) in DMF (1.0 mL) gelöst, zum Harz gegeben und 5 min geschüttelt. Das Harz wurde daraufhin mit DMF (1 x 1 min, 1 mL) gewaschen, der Vorgang wiederholt und nochmals mit DMF (5 x 1 min, 1 mL) gewaschen.

Zur Kupplung von Fmoc-Phe-OH auf die methylierte Aminosäure, wurde Fmoc-Phe-OH (155 mg, 400 µmol, 4.00 eq), HOAt (670 µL, 0.6 M in DMF, 400 µmol, 4.00 eq) und HATU (152 mg, 400 µmol, 4.00 eq) in DMF (1.0 mL) gelöst, DIPEA (134.4 µL, 800 µmol, 8.00 eq) zugegeben, gemischt, auf das Harz gegeben und 3 h geschüttelt. Anschließend wurde das Harz mit mit DMF (3 x 1 min, 1 mL) gewaschen und der Vorgang wiederholt.

Danach erfolgte das *Capping* der nicht reagierten Sequenzen und der Fmoc-Abspaltung wie bereits beschrieben.

Anschließend erfolgte die Kupplung von Fmoc-Asp-OH, wie bereits beschrieben.

Das Peptid wurde nun mit HFIP in DCM (20%, 4 x 20 min, 2 mL) vom Harz abgespalten und das Harz mit DCM (3 x 2 mL) gewaschen. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Peptid im Hochvakuum über Nacht getrocknet.

Anschließend erfolgte die Aufreinigung mittels HPLC (03-80 in 40 min, semipräparativ, binäres Lösungsmittelgemisch: A: H₂O/Acetonitril/TFA (98.9:1:0.1) B: Acetonitril/H₂O/TFA (98.9:1:0.1), 15 mL/min). Die vereinigten Fraktionen wurden in 15 mL Falcontubes vereinigt und gefriergetrocknet.

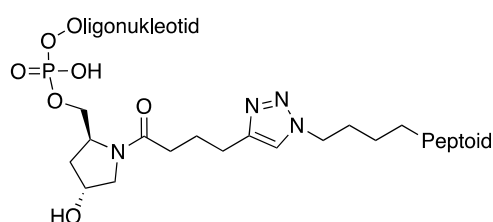
Zur Cyclisierung wurde das lineare Peptid in DMF (0.10 mM) gelöst und eine Lösung aus HATU (1.50 eq), HOBt (1.50 eq) und *sym*-Collidin (1.50 eq) in DMF (1 mL) innerhalb von 30 min zugegeben. Die Reaktionslösung wurde 24 h gerührt und mittels UHPLC-MS verfolgt. Nach Beendigung der Reaktion wurde das DMF unter vermindertem Druck entfernt und das Peptid über Nacht im Hochvakuum getrocknet.

Anschließend wurden die Schutzgruppen mit TFA/TIS/H₂O (96:2:2, 2 mL) innerhalb von 3 h entfernt und die Lösung bis zur Trockne mit einem Luftstrom eingengt.

Danach erfolgte die Aufreinigung mittels HPLC (10-50 in 60 min, semipräparativ, binäres Lösungsmittelgemisch: A: H₂O/Acetonitril/TFA (98.9:1:0.1) B: Acetonitril/H₂O/TFA (98.9:1:0.1), 12 mL/min). Die vereinigten Fraktionen wurden in 15 mL Falcontubes vereinigt und gefriergetrocknet. Das Azid-modifizierte Cilengitid (3.3 mg) wurde mit einer Gesamtausbeute von 5% erhalten.

Bis zur Kupplung an DNA wurde das azid-modifizierte Cilengitid bei 4 °C aufbewahrt.

6.3.12 Synthese der Peptoid-modifizierten DNA



Für die Peptoid-modifizierte DNA wurde ein alkinmodifiziertes Harz verwendet. Nach der automatisierten Festphasensynthese wurde das CPG 30 min im Vakuum getrocknet und in 2 mL Sarstedt-Gefäße überführt. Zur Abspaltung wurde das CPG mit konzentrier-

ter Ammoniak-Lösung (1 mL) versetzt, 4 Stunden bei 55 °C geschüttelt und anschließend abgekühlt. Der Ammoniak wurde mittels SpeedVac (ca. 30 min) und das Harz mittels Spritzenfilter entfernt. Die Lösung wurde mit Wasser auf 1 mL verdünnt und mittels HPLC gereinigt (20-50 in 12 min, semipräperativ, binäres Lösungsmittelgemisch: A: TEAA, wässrig, pH = 7.3 und B: Acetonitril, 8 mL/min).

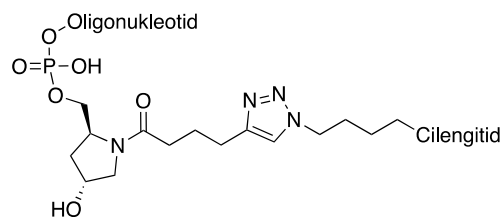
Die Produktfraktionen wurden in 15 mL Falcontubes vereinigt und mittels Gefriertrocknung vom Lösungsmittel befreit. Anschließend wurde die DNA drei Mal durch Fällung mit Isopropanol und Ammoniumacetat entsalzt.

Nach der Trocknung mittels Speed-Vac (30 min) wurde die DMT-Schutzgruppe entfernt. Dafür wurde zur DNA 70%ige Essigsäure (300 µL) gegeben und für 45 min geschüttelt. Anschließend wurde die DNA drei Mal durch Fällung mit Isopropanol und Ammoniumacetat entsalzt.

Zu der alkinmodifizierten DNA (200 nmol, 1.00 eq) in PUS-Puffer (100 mM Tris, 100 mM NaOAc, 1 mM MgCl₂, pH 8, 200 µL) wurde zunächst Natrium-*L*-ascorbat (3.96 mg, 20.0 µmol, 100 eq) und THPTA (4.78 mg, 11 µmol, 55.0 eq) in PUS-Puffer (300 µL) zugegeben. Anschließend wurde das Peptoid (entweder Peptoid 1 oder Peptoid 2) (1 µmol, 5.0 eq) in PUS-Puffer (500 µL) und eine Cu(II)-Sulfat-Lösung (150 mM, 15 µL) in PUS-Puffer zugegeben. Das Sarstedt-Tube wurde mit Argon versetzt und 5 h bei 55 °C geschüttelt. Danach wurde eine Spatelspitze Natriumhydrogensulfid Hydrat zugegeben und weitere 10 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Die Suspension wurde durch einen Spritzenfilter filtriert und mittels HPLC (10-30 in 30 min, semipräperativ, binäres Lösungsmittelgemisch: A: TEAA, wässrig, pH = 7.3 und B: Acetonitril, 8 mL/min) aufgereinigt. Die vereinigten Fraktionen wurden in 15 mL Falcontubes vereinigt, gefriergetrocknet und drei Mal durch Fällung mit Isopropanol und Ammoniumacetat entsalzt. Trocknung der DNA mittels SpeedVac lieferte die Peptoid-modifizierte DNA in guten Ausbeuten. Die Reinheit der DNA wurde mittels MALDI (THAP-Matrix) und analytischer HPLC (0-50% ACN in 15 min) überprüft.

Die DNA wurde bis zur Verwendung bei -20 °C aufbewahrt.

6.3.13 Synthese der Cilengitid-modifizierten DNA



Für die Cilengitid-modifizierte DNA wurde ein alkinmodifiziertes Harz verwendet. Nach der automatisierten Festphasensynthese wurde das CPG 30 min im Vakuum getrocknet und in 2 mL Sarstedt-Gefäße überführt. Zur Abspaltung wurde das CPG mit konzentrierter Ammoniak-Lösung (1 mL) versetzt, 4 Stunden bei 55 °C geschüttelt und anschließend abgekühlt. Der Ammoniak wurde mittels SpeedVac (ca. 30 min) und das Harz mittels Spritzenfilter entfernt. Die Lösung wurde mit Wasser auf 1 mL verdünnt und mittels HPLC gereinigt (20-50 in 12 min, semipräperativ, binäres Lösungsmittelgemisch: A: TEAA, wässrig, pH = 7.3 und B: Acetonitril, 8 mL/min).

Die Produktfraktionen wurden in 15 mL Falkontubes vereinigt und mittels Gefriertrocknung vom Lösungsmittel befreit. Anschließend wurde die DNA drei Mal durch Fällung mit Isopropanol und Ammoniumacetat entsalzt.

Nach der Trocknung mittels Speed-Vac (30 min) wurde die DMT-Schutzgruppe entfernt. Dafür wurde zur DNA 70%ige Essigsäure (300 μ L) gegeben und für 45 min geschüttelt. Anschließend wurde die DNA drei Mal durch Fällung mit Isopropanol und Ammoniumacetat entsalzt.

Zu der alkinmodifizierten DNA (200 nmol, 1.00 eq) in PUS-Puffer (100 mM Tris, 100 mM NaOAc, 1 mM MgCl_2 , pH 8, 200 μL) wurde zunächst Natrium-*L*-ascorbat (3.96 mg, 20.0 μmol , 100 eq) und THPTA (4.78 mg, 11 μmol , 55.0 eq) in PUS-Puffer (300 μL) zugegeben. Anschließend wurde das Cilengitid (1.0 μmol , 16 mM, 5.0 eq) in PUS-Puffer (500 μL) und eine Cu(II)-Sulfat-Lösung (150 mM, 15 μL) in PUS-Puffer zugegeben. Das Sarstedt-Tube wurde mit Argon versetzt und 5 h bei 55 °C geschüttelt. Danach wurde eine Spatelspitze Natriumhydrogensulfid Hydrat zugegeben und weitere 10 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Die Suspension wurde durch einen Spritzenfilter filtriert und mittels HPLC (10-30 in 30 min, semipräparativ, binäres Lösungsmittelge-

misches: A: TEAA, wässrig, pH = 7.3 und B: Acetonitril, 8 mL/min) aufgereinigt. Die vereinigten Fraktionen wurden in 15 mL Falcontubes vereinigt, gefriergetrocknet und drei Mal durch Fällung mit Isopropanol und Ammoniumacetat entsalzt. Trocknung der DNA mittels SpeedVac lieferte die Cilengitid-modifizierte DNA in guten Ausbeuten (48%). Die Reinheit der DNA wurde mittels MALDI (HPA-Matrix) und analytischer HPLC (0-50% ACN in 15 min) überprüft.

Die DNA wurde bis zur Verwendung bei -20 °C aufbewahrt.

6.3.14 Denaturierungsexperimente

Für die Denaturierungsexperimente wurden die Oligonukleotide in einem Verhältnis von 1:1 in einer Konzentration von 1 µM in den jeweiligen Puffern, die auch für die Messungen der Bindungsaffinitäten benutzt worden sind, gelöst. Danach wurden die Proben mittels eines Peltier temperierten Küvettenhalters auf 90 °C erhitzt und wieder auf 20 °C abgekühlt (10 K/min). Anschließend wurden drei Temperaturzyklen durchlaufen, indem die Proben zunächst auf 90 °C erhitzt, dann auf 20 °C gekühlt (1 K/min) und schließlich die Temperatur für 5 min konstant gehalten wurde. Bei jedem Aufheizvorgang wurde bei jeder Minute der Absorptionswert bei 260 nm aufgenommen. Zur Auswertung wurden die Kurven gemittelt, sigmoidal geplottet und der Extrempunkt der ersten Ableitung bestimmt, welcher dem Schmelzpunkt der DNA-Duplexe entsprach.

6.4 Affinitätsmessungen

6.4.1 Bestimmung der Affinitäten von Rhodamin B/ β -Cyclodextrin-Systemen

Die Bestimmung der Affinitäten (K_D -Werte) von Rhodamin B/ β -Cyclodextrin-Systemen erfolgte durch einen fluoreszenzbasierten Assay mit dem Fluoreszenzspektrometer. Für alle Messungen wurden 100 μ L Fluoreszenzküvetten benutzt. Vor den Messungen wurde die CD-DNA hybridisiert, indem sie auf 90 °C hochgeheizt und in 1 K/min auf 20 °C runtergekühlt wurde. Zunächst wurde die Rhodamin B-Komponente in einer Konzentration von 500 nM in Hepes-Puffer vorgelegt. Anschließend wurde eine Stock-Lösung, die sowohl die Rhodamin B (500 nM) als auch die β -Cyclodextrin-Komponente (8 mM, in HEPES-Puffer) beinhaltet hinzutitriert, bis sich die Fluoreszenzintensität der Rhodamin B-Komponente nicht mehr änderte. Die Spektren wurden bei einer Anregungswellenlänge von 550 nm aufgenommen. Für jeden Wert wurden jeweils drei voneinander unabhängige Emissionsspektren aufgenommen, sodass der K_D -Wert aus drei unabhängigen Messungen bestimmt worden ist. Die finalen Konzentrationen der β -Cyclodextrin-Komponente (c_{final}) und K_D -Werte sind in Tabelle 1 dargestellt. Die Fluoreszenzintensitätswerte wurden normalisiert und nach Gleichung 11 gefittet (Invitrogen Fluorescence Polarization Technical Resource Guide, 3rd edition, Invitrogen Corporation, Madison, 2004).

$$A = A_0 + (A_E - A_0) \left(\frac{\frac{G_0 + c + K_D}{2} \sqrt{\left(\frac{G_0 + c + K_D}{2}\right)^2 - G_0 c}}{G_0} \right) \quad (3)$$

K_D : Dissoziationskonstante

c : β -Cyclodextrin-Komponente

G_0 : Rhodamin B-Komponente

A : Normalisierte Fluoreszenzintensität der Rhodamin B-Komponente

A_E : Normalisierte Fluoreszenzintensität der vollständig gebundenen Rhodamin B-Komponente

A_0 : Normalisierte Fluoreszenzintensität der vollständig ungebundenen Rhodamin B-Komponente

Tabelle 1: K_D -Werte der Rhodamin B- β -Cyclodextrin Komplexe. Die jeweiligen Spektren sind im Anhang abgebildet.

Modellsystem	K_D -Wert [μ M] 1 mM $MgCl_2$ (c_{final} (CD) [mM])	K_D -Wert [μ M] 5 mM $MgCl_2$ (c_{final} (CD) [mM])	K_D -Wert [μ M] 10 mM $MgCl_2$ (c_{final} (CD) [mM])	K_D -Wert [μ M] 100 mM $MgCl_2$ (c_{final} (CD) [mM])
RCD	44 ± 4 (2.1)	39 ± 4 (0.4)		
R_LCD	101 ± 9 (2.2)			
RCD_{bvDNA}	88 ± 8 (0.51)			
R_{mvDNA}CD	1444 ± 206 (2.7)	297 ± 85 (2.2)	98 ± 21 (2.2)	92 ± 14 (2.2)
R_{bvDNA}CD	1139 ± 287 (3.4)	140 ± 32 (2.3)	99 ± 12 (2.2)	114 ± 14 (2.2)
R_{mvD}- NA CD_{mvDNA}				10.5 ± 2.1 (0.48)
R_{bvDNA}CD_{bvD}- NA			12 ± 2 (0.45)	4.5 ± 0.5 (0.22)

6.4.2 Bestimmung der Bindungsaffinität zwischen Rhodamin B und CB[7]-DNA

Die Bestimmung der Affinität (K_D -Werte) von Rhodamin B/CB[7]-DNA erfolgte durch einen fluoreszenzbasierten Assay mit dem Fluoreszenzspektrometer. Für die Messung wurden 100 μ L Fluoreszenzküvetten benutzt. Vor den Messungen wurde die CB[7]-DNA hybridisiert, indem sie auf 90 °C hochgeheizt und in 1 K/min auf 20 °C runtergekühlt wurde. Zunächst wurde die Rhodamin B-Komponente in einer Konzentration von 2.5 μ M in HEPES-Puffer, Wasser oder Phosphatpuffer vorgelegt. Anschließend wurde eine Stock-Lösung, die sowohl die Rhodamin B (2.5 μ M) als auch die CB[7]-Komponente (7 μ M in HEPES-Puffer, Wasser oder Phosphatpuffer) beinhaltete hinzutitriert, bis sich die Fluoreszenzintensität der Rhodamin B-Komponente nicht mehr änderte. Die Spektren wurden bei einer Anregungswellenlänge von 550 nm aufgenommen. Für jeden Wert wurden jeweils drei voneinander unabhängige Emissionsspektren aufgenom-

men, sodass der K_D -Wert aus drei unabhängigen Messungen bestimmt worden ist. Die finalen Konzentrationen der CB[7]-Komponente (c_{final}) und K_D -Werte sind in Tabelle 2 dargestellt.

Die Fluoreszenzintensitätswerte wurden normalisiert und nach Gleichung 11 gefittet (Invitrogen Fluorescence Polarization Technical Resource Guide, 3rd edition, Invitrogen Corporation, Madison, 2004) (s. 6.4.1).

Tabelle 2: K_D -Werte der Rhodamin B und CB[7]-Komplexe. Die jeweiligen Spektren sind im Anhang abgebildet.

Modellsystem	K_D -Wert [μM] HEPES (c_{final} (CD) [μM])	K_D -Wert [μM] Wasser (c_{final} (CD) [μM])	K_D -Wert [μM] Phosphatpuffer (c_{final} (CD) [μM])
RCB[7]	n.b. (60)	5.1 ± 0.7 (720)	30.8 ± 5.4 (720)
RCB[7] _{DNA}			84.6 ± 13.8 (175)

6.4.3 Bestimmung der Bindungsaffinität zwischen Pyronin B und CB[7]-DNA

Die Bestimmung der Affinitäten (K_D -Werte) von Pyronin B/CB[7]-Systemen erfolgte durch einen fluoreszenzbasierten Assay mit dem Fluoreszenzspektrometer oder mit einem Plattenlesegerät. Vor den Messungen wurde die CB[7]-DNA hybridisiert, indem sie auf 90 °C hochgeheizt und in 1 K/min auf 20 °C runtergeköhlt wurde. Für alle Messungen am Fluoreszenzspektrometer wurden 100 μL Fluoreszenzküvetten benutzt und die Messungen wurden bei 25 °C durchgeführt. Zunächst wurde die Pyronin B-Komponente in einer Konzentration von 100 nM in Phosphatpuffer vorgelegt. Anschließend wurde eine Stock-Lösung, die sowohl die Pyronin B (100 nM) als auch die CB[7]-Komponente (7 μM , in Phosphatpuffer) beinhaltet hinzutitriert, bis sich die Fluoreszenzintensität der Pyronin B-Komponente nicht mehr änderte. Die Spektren wurden bei einer Anregungswellenlänge von 525 nm aufgenommen. Für jeden Wert wurden jeweils drei voneinander unabhängige Emissionsspektren aufgenommen, sodass der K_D -Wert aus drei unabhängigen Messungen bestimmt worden ist.

Die Messungen am Plattenlesegerät wurden in einer Optiplatte 96F-Wellplatte bei 25 °C durchgeführt ($\lambda_{\text{ex}} = 480 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 540 \text{ nm}$, Anregungszeit: 1 s). Dafür wurde zunächst

eine Stocklösung der CB[7]-DNA (20 μM in Phosphatpuffer, Volumen: 50 μL) vorbereitet und eine 1:1 Verdünnung in der Wellplatte durchgeführt. Anschließend wurde die Pyronin B-Komponente (200 nM, 50 μL , in Phosphatpuffer) hinzutitriert, sodass sich ein Gesamtvolumen von 100 μL ergab. Vor den Messungen wurde die Platte zentrifugiert, um eventuelle Luftbläschen zu entfernen. Der K_D -Wert ergab sich aus drei unabhängigen Messungen und ist in Tabelle 3 dargestellt.

Die Fluoreszenzintensitätswerte wurden normalisiert und nach Gleichung 11 gefittet (Invitrogen Fluorescence Polarization Technical Resource Guide, 3rd edition, Invitrogen Corporation, Madison, 2004) (s. 6.4.1).

Tabelle 3: K_D -Werte von Pyronin B und CB[7]-modifizierten DNA. Die jeweiligen Spektren sind im Anhang abgebildet.

Modellsystem	K_D -Wert [μM] Fluoreszenzspektrometer (c_{final} (CB[7]) [μM])	K_D -Wert [μM] Plattenlesegerät (c_{final} (CD) [μM])
RCB[7] _{DNA}	2.3 ± 0.3 (7)	2.0 ± 0.4 (10)

6.4.4 Kontrollexperimente mit Pyronin B

Es wurden zwei Kontrollexperimente mit Pyronin B durchgeführt, um eine Interaktion mit DNA während den Bindungsmessungen auszuschließen.

Die Messungen wurden am Plattenlesegerät in einer Optiplatte 96F-Wellplatte bei 25 °C durchgeführt ($\lambda_{\text{ex}} = 480 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 540 \text{ nm}$, Anregungszeit: 1 s). Dafür wurde zunächst eine Stocklösung der DNA oder der CB[7]-DNA (400 (CB[7]-DNA oder 800 μM (DNA-ds) in Phosphatpuffer, Volumen: 50 μL) vorbereitet und eine 1:1 Verdünnung in der Wellplatte durchgeführt. Anschließend wurde die Pyronin B-Komponente (20 μM , 50 μL , in Phosphatpuffer) hinzutitriert, sodass sich ein Gesamtvolumen von 100 μL ergab. Vor den Messungen wurde die Platte zentrifugiert, um eventuelle Luftbläschen zu entfernen.

6.4.5 Verdrängungsexperiment: Konkurrenz von Rhodamin B mit Adn-DNA-Komplexen aus CB[7]-DNA-Komplexen

Die Verdrängungsexperimente wurden am Plattenlesegerät in einer Optiplatte 96F-Wellplatte bei 25 °C durchgeführt ($\lambda_{\text{ex}} = 531 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 590 \text{ nm}$, Anregungszeit: 1 s). Dafür wurde zunächst eine Stocklösung der Adn-DNA in Phosphatpuffer vorbereitet und eine 1:1 Verdünnung ($V = 50 \mu\text{L}$) in der Wellplatte durchgeführt. Die Konzentrationen der Stocklösungen wurden so gewählt, dass sie das erste Well eine doppelt so hohe Konzentration hatte wie der Messpunkt mit der höchsten Konzentration. Anschließend wurde die Rhodamin B-Komponente ($5 \mu\text{M}$) zusammen mit der CB[7]-DNA-Komponente ($80 \mu\text{M}$) in Phosphatpuffer ($50 \mu\text{L}$) hinzutitriert, sodass sich ein Gesamtvolumen von $100 \mu\text{L}$ ergab. Vor den Messungen wurde die Platte zentrifugiert, um eventuelle Luftbläschen zu entfernen. Die Fluoreszenzintensitätswerte wurden normalisiert und nach einem Dosis-Wirkungs-Modell mit variabler Steigung gefittet:

$$A = A_E + \frac{A_0 - A_E}{1 + 10^{\log(IC_{50}-c)h_s}} \quad (4)$$

A_0 , A_E und h_s (Hillslope) wurden durch die GraphPad Prism Software bestimmt.

IC_{50} : IC_{50} -Wert

c : Konzentration der Adn-Komponente

A : Normalisierte Fluoreszenzintensität der Rhodamin B-Komponente

A_E : Normalisierte Fluoreszenzintensität der vollständig gebundenen Rhodamin B-Komponente

A_0 : Normalisierte Fluoreszenzintensität der vollständig ungebundenen Rhodamin B-Komponente

H_s : Hillslope

Die IC_{50} -Werte ergaben sich aus drei unabhängigen Messungen und sind in Tabelle 4 dargestellt.

Tabelle 4: IC50-Werte der Verdrängungsexperimente von Rhodamin B/CB[7]/-DNA/Adn-DNA. Die jeweiligen Spektren sind im Anhang abgebildet.

Modellsystem	IC50-Wert [μM] 1 mM MgCl_2 (c_{final} (Adn) [μM])	IC50-Wert [μM] 10 mM MgCl_2 (c_{final} (Adn) [μM])	IC50-Wert [μM] 10 mM MgCl_2 , 0.5% BSA (c_{final} (Adn) [μM])
bCAbA1	8.4 ± 1.4 (300)		
bCBmA1_a	9.7 ± 2.6 (300)		
bCAbA2	6.1 ± 0.6 (300)	2.9 ± 0.8 (300)	4.8 ± 1.2 (200)
bCBmA2_a	7.4 ± 1.6 (300)	5.1 ± 0.8 (300)	12.9 ± 2.6 (200)
bCBmA2_b		4.5 ± 0.5 (300)	13.1 ± 4.6 (200)
mCB_amA2_a			9.3 ± 2.4 (200)
mCB_amA2_a_fl			15.2 ± 4.1 (200)
mCB_bmA2_a			18.9 ± 3.4 (200)
mCB_bmA2_a_fl			10.4 ± 2.5 (200)
mCB_amA2_a_k			10.5 ± 2.9 (200)
mCB_a-mA2_a_k/üh			12.7 ± 3.8 (200)

6.4.6 Konkurrenz von Pyronin B mit Ad2-DNA aus CB[7]-DNA

Die Verdrängungsexperimente wurden am Plattenlesegerät in einer Optiplatte 96F-Wellplatte bei 25 °C durchgeführt ($\lambda_{\text{ex}} = 480 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 540 \text{ nm}$, Anregungszeit: 1 s). Dafür wurde eine Stocklösung der Ad2-DNA in Phosphatpuffer vorbereitet und eine 1:1 Verdünnung ($V = 50 \text{ }\mu\text{L}$) in der Wellplatte durchgeführt. Die Konzentrationen der Stocklösungen wurden so gewählt, dass das erste Well eine doppelt so hohe Konzentration hatte wie der Messpunkt mit der höchsten Konzentration. Anschließend wurde Pyronin B (400 nM) zusammen mit der CB[7]-DNA (2 μM) in Phosphatpuffer (50 μL) hinzutitriert, sodass sich ein Gesamtvolumen von 100 μL ergab. Vor den Messungen wurde die Platte zentrifugiert, um eventuelle Luftbläschen zu entfernen. Die Fluoreszenzintensitätswerte wurden normalisiert und nach einem Dosis-Wirkungs-Modell mit variabler Steigung (Gleichung 12) gefittet (s. 6.4.5). In Tabelle 5 sind die IC50-Werte zusammengefasst.

Tabelle 5: IC50-Werte der Verdrängungsexperimente von Pyronin B/CB[7]/-DNA/Adn-DNA. Die jeweiligen Spektren sind im Anhang abgebildet.

Modellsystem	IC50-Wert [μM] (c_{final} (Ad2) [μM])	Modellsystem	IC50-Wert [μM] (c_{final} (Ad2) [μM])
30:bCAbA2	0.48 ± 0.05 (20)	42:mCB_amA2_b	0.34 ± 0.07 (2.5)
30:bCBmA2_a	1.00 ± 0.24 (20)	42:mCB_bmA2_a	0.58 ± 0.14 (2.5)
30:bCBmA2_b	1.06 ± 0.21 (21)	42:mCB_bmA2_b	0.39 ± 0.12 (10)
30:mCB_amA2_a	0.41 ± 0.07 (20)	43:bCAbA2	0.36 ± 0.07 (7)
30:mCB_amA2_b	0.31 ± 0.05 (20)	43:bCBmA2_a	0.75 ± 0.11 (7)
30:mCB_bmA2_a	0.52 ± 0.12 (20)	43:bCBmA2_b	1.00 ± 0.15 (7)
30:mCB_bmA2_b	0.40 ± 0.1 (20)	43:mCB_amA2_a	0.40 ± 0.08 (7)
42:bCAbA2	0.59 ± 0.12 (2.5)	43:mCB_amA2_b	0.61 ± 0.14 (2.5)
42:bCBmA2_a	0.80 ± 0.15 (10)	43:mCB_bmA2_a	0.23 ± 0.05 (7)
42:bCBmA2_b	0.81 ± 0.15	43:mCB_bmA2_b	1.00 ± 0.10

	(7)	(7)
42:mCB_amA2_a	0.30 ± 0.04	
	(2.5)	

6.4.7 Bestimmung der Bindungskonstanten durch FRET-Messungen

Für die Bestimmung der K_D -Werte wurde zunächst eine 3:4 Verdünnungsreihe der Cy5-Komponente in einer 96-well Platte hergestellt (25 μ L pro Well in Phosphatpuffer, 10 mM NaH_2PO_4 , 5 mM MgCl_2 , pH 7.5). Die höchsten Konzentrationen der Cy5-Komponente betrugen 237-4000 nM. Anschließend wurde die Cy3-Komponente (75 μ L, c (Stock-Lösung) = 13.33 nM in Phosphatpuffer, c (total) = 10 nM, V (total) = 100 μ L) zugegeben und die Lösung mit der Pippette gemischt. Die Platte wurde für eine Minute zentrifugiert, um Luftbläschen zu vermeiden und die Cy3-Fluoreszenzintensität wurde mit einem Plattenlesegerät ausgelesen ($\lambda_{\text{ex}} = 531$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 590$ nm). Der Hintergrund der Emission der Cy5-Komponente (bestimmt bei der Messung ohne die Cy3-Komponente) wurde subtrahiert. Die Fluoreszenzintensitätswerte wurden normalisiert und nach Gleichung 13 gefittet (Invitrogen Fluorescence Polarization Technical Resource Guide, 3rd edition, Invitrogen Corporation, Madison, 2004). Die K_D -Werte wurden aus mindestens drei unabhängigen Messungen bestimmt.

$$A = A_0 + (A_E - A_0) \left(\frac{\frac{G_0 + c + K_D}{2} \sqrt{\left(\frac{G_0 + c + K_D}{2}\right)^2 G_0 c}}{G_0} \right) \quad (5)$$

K_D : Dissoziationskonstante

c : Konzentration der Cy5-CB[7]-DNA

G_0 : Konzentration der Cy3-Adn-DNA

A : Normalisierte Fluoreszenzintensität der Cy3-Adn-DNA

A_E : Normalisierte Fluoreszenzintensität der vollständig gebundenen Cy3-Adn-DNA

A_0 : Normalisierte Fluoreszenzintensität der vollständig ungebundenen Cy3-Adn-DNA

Tabelle 6: K_D -Werte für die Interaktion zwischen CB[7]-DNA-Komplexen und Adn-DNA-Komplexen. Die jeweiligen Spektren sind im Anhang abgebildet.

Komplex	K_D / nM	Komplex	K_D / nM	Komplex	K_D / nM
mCA1_a	66.4 ± 7.3	bCA1 ₄₂	16.6 ± 2.4	mCA2_a	700 ± 73
mCA1_b	61.6 ± 14.9	bCA1 ₆₃	22.9 ± 1.9	bCA2 ₂₁	67 ± 18
mCA1_c	60.1 ± 8.5	bCA1 ₈₄	28.5 ± 4.3	bCA2 ₃₁	138 ± 30
mCA1_d	66.7 ± 13.2	bCA1 ₁₀₅	32.6 ± 5.6	bCA2 ₄₂	369 ± 50
mCA1_e	64.9 ± 9.7	bCA1 _{22f}	12.2 ± 4.1	bCA2 ₆₃	348 ± 57
bCA1 ₂₁	3.6 ± 0.8	bCA1 _{23f}	18.9 ± 3.9	bCA2 _{22f}	103 ± 25
bCA1 ₃₁	10.9 ± 1.4	bCA1_mm	30.7 ± 4.3	bCA2 _{23f}	203 ± 48

6.4.7 Kontrollexperiment zur Untersuchung des Einflusses der Cy5-modifizierten DNA auf die Fluoreszenzintensität der Cy3-Adn-DNA

Um den möglichen Einfluss des Cy3-Farbstoffes mit dem Cy5-DNA-Komplex auszuschließen, wurde die Emissionsintensität des Komplexes bA1₂₁ bei verschiedenen Konzentrationen der Cy5-DNA gemessen. Hierfür wurde eine 1:1 Verdünnungsreihe der Cy5-Komponente hergestellt (Anfangskonzentration: 4 μ M). Die Experimente wurden, wie in Kapitel 6.4.6 beschrieben, durchgeführt (Konzentration des Ad1-Komplexes: 10 nM in Phosphatpuffer).

6.4.8 Charakterisierung von Quervernetzung

Für die Charakterisierung des Anteils an Quervernetzung wurde zunächst eine positive Kontrolle durchgeführt. Ein 42 nt langer DNA Strang (Cy5-42mer-Cy3, Tabelle 7), wel-

cher am 3'-Ende mit Cy5 und am 5'-Ende mit Cy3 markiert war, wurde mit einem komplementären Strang im Phosphatpuffer (10 μ M, 10 mM NaH₂PO₄, 5 mM MgCl₂, pH 7.5) hybridisiert (Komplementäre-DNA-42, Tabelle 7). Die Fluoreszenzintensität dieses Komplexes bei einer Konzentration von 10 μ M wurde als 0% Quervernetzung festgelegt. Weiterhin wurde ein komplementär markierter DNA-Strang (Cy3-42mer-Cy5, Tab. 7) mit einem komplementären Strang im Phosphatpuffer hybridisiert (10 μ M, 10 mM NaH₂PO₄, 5 mM MgCl₂, pH 7.5) und die Fluoreszenzintensität gemessen. Dieser Wert unterschied sich nicht signifikant vom erst beschriebenen System. Die Fluoreszenzintensität nach der Hybridisierung von Cy5-42mer-Cy3, Cy3-42mer-Cy5 separat und in einem 1:1-Verhältnis mit einem Verbindungstrang (Connector-DNA-42, Tabelle 7), wurde als 100% Quervernetzung festgelegt. Die beiden separaten Werte der beiden Stränge unterschieden sich nicht signifikant und der Wert sank auf etwa 10% im Vergleich zu dem Komplex mit der komplementären DNA (Cy5-42mer-Cy3: 9.1%, Cy3-42mer-Cy5: 10.7%). Der Cy3-Fluoreszenzintensitätswert für den gemischten Fall war höher (Cy5-42mer-Cy3, Cy3-42mer-Cy5, 1:1 34.4%). Für die Auswertung wurden die Werte von 9.1% und 34.4% verwendet, da nicht vorhergesagt werden kann, in was für einem Verhältnis die beiden quervernetzten-Varianten vorliegen. Vor den Messungen wurden die Komplexe auf 90 °C erhitzt, langsam auf 25 °C mit einer Rate von 1 K/min abgekühlt und die Platte wurde bei 1 min lang zentrifugiert, um Luftbläschen zu vermeiden. Die Cy3-Fluoreszenzintensität wurde in einer Optiplatte 396 Well-Platte mit einem Mikrotiter-Plattenlesegerät vermessen (Gesamtvolumen: 20 μ L, λ_{ex} = 531 nm, λ_{em} = 590 nm) und die Werte wurden aus drei unabhängigen Messungen bestimmt.

Für die Bestimmung des Anteils an Quervernetzung, wurden die bivalenten CB[7]- und Admantan-Komplexe in einem 1:1 Verhältnis in den Konzentrationen 10 μ M, 50 μ M, 100 μ M, 150 μ M und 200 μ M in Phosphatpuffer vermischt. Die Cy3-Fluoreszenzintensitäten wurden in einer Optiplatte 396 Well-Platte (Gesamtvolumen: 20 μ L) gemessen und die Werte wurden aus drei unabhängigen Messungen bestimmt. Vor den Messungen wurden die Komplexe auf 90 °C erhitzt, langsam auf 25 °C mit einer Rate von 1 K/min abgekühlt und die Platte wurde 1 min lang zentrifugiert, um Luftbläschen zu vermeiden. Für die Auswertung wurden die erhaltenen Werte auf 9.1% und auf 34.4% normiert, um eine Aussage über den Anteil an Quervernetzung treffen zu können.

Nachweis der bimolekularen Bindungsweise

Die bivalenten Rezeptoren bC₂₁ und bC₆₃ trugen keine Fluoreszenzmarkierung. Es wurde zunächst eine 1:1 Verdünnungsreihe der bC₂₁-Komponente in einer Optiplate 96F Platte vorbereitet (50 µL pro Well in Phosphatpuffer: 10 mM NaH₂PO₄, 5 mM MgCl₂, pH 7.5) (höchsten Konzentration: 8 µM). Anschließend wurde die bA1₂₁-Komponente hinzutitriert (50 µL, c (stock-Lösung) = 20 nM in Phosphat Puffer c (total) = 10 nM, V (total) = 100 µL) und die Lösungen wurden mit einer Pippette vermischt. Die Cy3-Fluoreszenzintensität wurde mit einem Plattenlesegerät bestimmt ($\lambda_{\text{ex}} = 531 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 590 \text{ nm}$). Dieselbe Vorgehensweise wurde angewendet, um den multimolekularen Bindungsmechanismus zwischen bC₂₁ und bA2₂₁, bC₆₃ und bA1₆₃ und bC₆₃ und bA2₆₃ zu bestimmen. Vor den Messungen wurden die Komplexe auf 90 °C erhitzt, langsam auf 25 °C mit einer Rate von 1 K/min abgekühlt und die Platte wurde 1 min lang zentrifugiert, um Luftbläschen zu vermeiden.

6.4.9 Zusatz zu den Berechnungen zur Reichweite des Bivalenzeffekts

Freie Bindungsenergie

Im Folgenden wird ein Ausdruck für die Energiegewinnung der Dissoziationskonstanten von monovalenten und bivalenten Liganden hergeleitet.

Die Dissoziationskonstante von monovalenten Liganden K_{mono} wird definiert als:

$$K_{\text{mono}} = \frac{[L_{\text{mono}}][R_{\text{mono}}]}{[L_{\text{mono}}R_{\text{mono}}]} \quad (6)$$

Wobei $[L_{\text{mono}}]$ und $[R_{\text{mono}}]$ die Konzentrationen von den ungebundenen monovalenten Liganden und Rezeptoren sind und $[L_{\text{mono}}R_{\text{mono}}]$ die Konzentration von den gebundenen monovalenten Ligand-Rezeptorpaaren ist. Für bivalente Liganden-Rezeptor Paare ist die Dissoziationskonstante wie folgt definiert:

$$\tilde{K}_{bi} = \frac{[L_{bi}][R_{bi}]}{[L_{bi}R_{bi}]} \quad (7)$$

$[L_{bi}]$ und $[R_{bi}]$ sind hier die Konzentrationen von ungebundenen bivalenten Liganden und Rezeptoren und $[L_{bi} R_{bi}]$ ist die Konzentration von den gebundenen bivalenten Ligand-Rezeptorpaaren, wobei hierbei die monovalent und bivalent gebundene Paare inkludiert sind.

Die zwei Dissoziationskonstanten K_{mono} und \tilde{K}_{bi} können nicht direkt verglichen werden. K_{mono} beschreibt die Bindungsaffinität zwischen monovalenten Liganden und monovalenten Rezeptoren und \tilde{K}_{bi} beschreibt die Dissoziationskonstante zwischen bivalenten Liganden und bivalenten Rezeptoren. Um die Bindungsaffinität von monovalenten und bivalenten Liganden quantitativ vergleichen zu können, wurde eine bivalente Dissoziationskonstante K_{bi} definiert, die die monovalenten und bivalenten Untereinheiten mitberücksichtigt. Hierfür werden zunächst die äquivalenten monovalenten Konzentrationen $[L_{mono}]_{eq}$ und $[R_{mono}]_{eq}$ als $[L_{mono}]_{eq} = 2 \cdot [L_{bi}]$ und $[R_{mono}]_{eq} = 2 \cdot [R_{bi}]$ definiert. $[L_{mono}]_{eq}$ beschreibt hierbei die Konzentration der Ligandenuntereinheiten (Konzentration der Adamantan-Untereinheiten) und $[R_{mono}]_{eq}$ die Konzentration der Rezeptoruntereinheiten (Konzentration der CB[7]-Untereinheiten). Hieraus kann nun die Dissoziationskonstante in Abhängigkeit der äquivalenten monovalenten Liganden und Rezeptoren wie folgt beschrieben werden:

$$K_{bi} := \frac{[L_{mono}]_{eq}[R_{mono}]_{eq}}{[L_{bi}R_{bi}]} = 4\tilde{K}_{bi}, \quad (8)$$

Weiter unten wird eine Formel für den Ausdruck von K_{bi} in Abhängigkeit von K_{mono} und der effektiven Konzentration hergeleitet (Formel 10). Mit dem Vergleich von K_{bi} und K_{mono} können multivalente Effekte quantifiziert werden.

Als nächstes werden die Bindungsmodi diskutiert, mit denen bivalente Ligand/Rezeptor Paare interagieren können. Ein bivalenter Rezeptor kann entweder monovalent oder bivalent and einen bivalenten Rezeptor binden. Die Konzentration von gebundenen Ligand/Rezeptor-Paaren kann dann wie folgt geschrieben werden:

$$[L_{bi}R_{bi}] = 4 \frac{[L_{bi}][R_{bi}]}{K_{mono}} + 2 \frac{[L_{bi}][R_{bi}]c_{eff}}{K_{mono}^2}, \quad (9)$$

Hierbei ist c_{eff} die effektive Konzentration, die die Wahrscheinlichkeit beschreibt mit der ein bivalenter Ligand zwei Bindungsseiten eines bivalenten Rezeptors bindet. Die Vorfaktoren 4 und 2 in Gleichung 9 stehen für die Anzahl der Permutation mit der die Liganden und Rezeptoren in jedem Bindungsmodus binden können. Aus den Gleichungen 7, 8 und 9 ergibt sich nun folgender Ausdruck für die bivalente Dissoziationskonstante:

$$K_{bi} = \left[\frac{1}{K_{mono}} + \frac{c_{eff}}{2K_{mono}} \right]^{-1}, \quad (10)$$

Aus der Formel 10 ergibt sich nun, dass wenn die effektive Konzentration ($c_{\text{eff}} = 0$) den Wert Null annimmt, die bivalente Dissoziationskonstante den Wert der monovalenten Dissoziationskonstante annimmt ($K_{bi} = K_{mono}$).

Die Dissoziationskonstante ist exponentiell abhängig von der freien Bindungsenergie. Hieraus kann nun der Gewinn der freien Bindungsenergie (ΔG_{gain}) folgendermaßen definiert werden:

$$\Delta G_{\text{gain}} = -k_B T (\ln(K_{bi}) - \ln(K_{mono})) = k_B T \ln \left(1 + \frac{c_{eff}}{2K_{mono}} \right), \quad (11)$$

Hierbei ist $k_B T$ die thermische Energie.

Effektive Konzentration

Um die effektive Konzentration von bivalenten Liganden zu bestimmen, wird das DNA-Gerüst als harmonische Feder mit einer durchschnittlichen Länge d und einer durchschnittlichen Längenfluktuation Δr modelliert. Die freie Energie (F) einer solchen Feder ist von dem Ende-zu-Ende Abstand r abhängig:

$$F(r) = \frac{(d - r)^2}{2\Delta r^2} k_B T, \quad (12)$$

Mit Formel 12 kann nun die effektive Konzentration (c_{eff}) in abhängigkeit des Ende-zu-Ende-Abstandes d geschrieben werden:

$$\begin{aligned}
c_{eff} &= \frac{\exp[-F(r=d)/k_B T]}{4\pi^2 \int_0^\infty dr' r'^2 \exp[-F(r')/k_B T]} \approx \frac{\exp\left[-\frac{F(r=d)}{k_B T}\right]}{4\pi^2 \int_{infy}^\infty dr' r'^2 \exp\left[-\frac{F(r')}{k_B T}\right]} \\
&= \frac{1}{(2\pi)^{3/2} \Delta r d^2}, \quad (13)
\end{aligned}$$

Hierbei wurde angenommen, dass die Längenfluktuation viel kleiner ist, als die mittlere Länge ($\Delta r \ll d$). Weiterhin kann die mittlere Längenfluktuation folgendermaßen beschrieben werden: $\Delta r = 0.1d^2/l_p$, wobei d , die Länge des DNA-Gerüsts und l_p die Persistenzlänge beschreibt. Außerdem soll die Interaktion des DNA-Gerüsts mit dem Faktor g (dem Interaktionsfaktor pro Einheit) beschrieben werden. Hierbei können entweder attraktive oder repulsive Wechselwirkungen angenommen werden. Aus diesen Annahmen ergibt sich nun für die effektive Konzentration (c_{eff}):

$$c_{eff} = \frac{l_p}{(2\pi)^{3/2} 0.1d^4} e^{-gd/k_B T}, \quad (14)$$

6.5 Biochemische Methoden

6.5.1 Native Gelelektrophorese

Der Nachweis der hybridisierten Oligonukleotide erfolgte durch native Gelelektrophorese in einer Gelelektrophoresekammer EASYPHOR PAGE MINI von BIOZYM. Es wurden 20%ige Gele (2 mL TB-Puffer, 5 mL RotiphoreseGel 40®, 2.6 mL H₂O, 100 µL 10%ige wässrige APS-Lösung, 10 µL TEMED) ohne Sammelgel verwendet. Vor dem Auftragen auf das Gel, wurden die Proben hybridisiert, indem sie auf 90 °C hochgeheizt und langsam (1 K/min) auf 20 °C abgekühlt worden sind. Vor der Gelelektrophorese wurde ein Vorlauf (30 min, 100 V) durchgeführt. Anschließend wurden die DNA-Komplexe auf das Gel (2.5 µM und 5 µM) in 10 µL Ladepuffer (89 mM Tris, 89 mM H₃BO₃, 1 mM MgCl₂, 150 mM NaCl) aufgetragen. Als Leiter wurde die ULTRA LOW RANGE DNA-LADDER von THERMOFISCHER jeweils in die äußersten Taschen aufgetragen. Die Gelelektrophorese wurde bei 4 °C über 4 h bei 100 V laufen gelassen. Anschließend wurde das Gel mit SYBRGOLD (THERMOFISCHER) angefärbt (10 min) und in einer Klarsichtfolie an der Image Station MM PRO KODAK visualisiert.

6.5.2 Behandlung der Zellen mit den Komplexen und anschließende Zelllysis

Für die ELISA-Assays wurden Zelllysate der HUVEC-Zellen (2.-6. Passage) angefertigt. Dafür wurden die Zellen (60000-80000 pro Well) in einer 6-Well-Platte ausplattiert und die Zellen 16-18 h ausgehungert (1% FCS).^{114, 120} Zur Kontrolle wurde immer auch Zellen mitgeführt, die nicht ausgehungert wurden (10% FCS). Zunächst wurde das Medium entfernt und mit HANKS-BALANCED SOLUTION (1 x 1.5 mL) gewaschen. Anschließend wurden die zuvor hybridisierten DNA-Komplexe in verschiedenen Konzentrationen (0.5-2000 nM) zusammen mit VEGF (1.3 nM in HANKS-BALANCED SOLUTION) in 1.5 mL auf die Zellen gegeben und 10 min bei RT inkubiert. Als Kontrolle wurden ebenfalls Zellen in einem Well nur mit VEGF (1.3 nM) behandelt. Danach wurden die Zellen mit kalter HANKS-BALANCED SOLUTION (1 x 1.5 mL) gewaschen und kalter Lysispuffer (40 µL, 1 mM PMSF in Lysispuffer) hinzugegeben. Die Zellen wurden 5 min auf Eis mit

dem Lysispuffer inkubiert, mit einem Zellschaber von der Wellplatte entfernt und in 1.5 mL Eppendorfbehälter überführt. Anschließend wurden die Zellen jeweils 2 min bei 4 °C sonifiziert und danach zentrifugiert (10 min bei 14000 rcf). Nach der Zentrifugation wurden 35 µL der Lysate in frische 1.5 mL Eppendorfgefäße überführt und der Rest für den BCA-Assay verwendet. Bis zum ELISA-ASSAY wurden die Zelllysate bei -80 °C aufbewahrt.

6.5.3 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Die Bestimmung von Proteinkonzentrationen wurde mittels einem PIERCETM BCA KIT ASSAY von THERMO FISCHER SCIENTIFIC durchgeführt. Dafür wurde zunächst eine Stamm-Lösung von BSA (10 µg/µL) in HANKS BALANCED SOLUTION angefertigt. Anschließend wurde eine 1:1-Verdünnung durchgeführt und somit eine Standardreihe erhalten. Diese wurde drei Mal in eine 96 Well-Platte pipettiert (2 µL). Somit beinhaltete jede Standardreihe acht Messpunkte mit Konzentrationen von 0.8 µg/µL bis 10 µg/µL. Dabei wurden die einzelnen Konzentrationen jeweils doppelt pipettiert. Neben der Standardreihe wurde ebenfalls jeweils drei Mal HANKS BALANCED SOLUTION (2 µL) und der Lysispuffer (2 µL) pipettiert. Auch 2 µL der Lysate wurden ebenfalls doppelt in die 96-Well Platte pipettiert. Anschließend wurde entsprechend der Durchführung des Kits die BCA-Lösung hergestellt und 100 µL dieser Lösung in jedes Well pipettiert. Die Platte wurde danach 2 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert und nach der Inkubationszeit die Absorptionen bei 560 nm aufgenommen. Von den Absorptionen der BCA-Lösungen wurde der mittlere Wert für die HANKS BALANCED SOLUTION subtrahiert und ein linearer Fit durch die mittlere Standardreihe gelegt. Von den Werten der Lysate wurde der mittlere Wert des Lysispuffers subtrahiert und die Werte für die Proteinkonzentrationen konnten durch den linearen Fit berechnet werden.

6.5.4 Bestimmung der VEGFR2-Phosphorylierung (Tyr1175)

Die Bestimmung der VEGFR2-Phosphorylierung (Tyr1175) erfolgte mittels eines PATH-SCAN[®] PHOSPHO-VEGFR-2-(TYR1175) SANDWICH ELISA KIT von CELL SIGNALLING TECHNOLOGIES. Dafür wurden die Lysate in einer Konzentration von 0.1-0.15 µg/µL eingesetzt. Der Assay wurde, wie im Kit beschrieben, durchgeführt und das Auslesen der

Absorptionswerte am Plattenlesegerät vorgenommen. Es wurden jeweils zwei Absorptionswerte aus einem Lysat produziert. Dies wurde, je nach Kapazität des Kits auch doppelt oder dreifach wiederholt. Die Werte wurden gemittelt und auf den Absorptionswert für das Lysat normiert, bei dem die Zellen nicht mit den Komplexen behandelt worden sind.

6.5.5 Fluoreszenzmikroskopie

Für die Fluoreszenzmikroskopie wurden die Zellen in 8-Well-Ibidi ausplattiert (HUVEC: 20000 pro Well, HEK293: 18000 pro Well). Vor den Messungen wurden die Zellen 16-18 Stunden auf 1% FCS ausgehungert. Das Medium mit 1% FCS wurde von Christina Kuznia, Christina Klotz oder Jaqueline Schneider aus dem AK Seitz hergestellt. Vor den Messungen wurde das Medium entfernt, einmal mit warmer HANKS BALANCED SOLUTION (200 μ L) mit der Pipette gewaschen und Blocklösung (188 μ L) hinzugegeben. Die Zellen wurden bei Raumtemperatur für 7 min mit der Blocklösung inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe der Komplexe (10 μ L, 20fache Konzentration) und VEGF (2 μ L, 130 nM) in HANKS BALANCED SOLUTION. Nach der Inkubation (5 min) bei 37 °C wurden die Zellen mit HANKS BALANCED SOLUTION (5 x 200 μ L) gewaschen und 200 μ L HANKS BALANCED SOLUTION hinzugegeben. Bei Messungen ohne die Blocklösung wurden die Zellen sofort gewaschen und mit den Komplexen behandelt. Anschließend wurden die Bilder mit dem Fluoreszenzmikroskop generiert. Pro Well wurden 5-10 Bilder gemacht. Es wurden Bilder sowohl mit dem Hellfeld- als auch mit dem TRITC-Filter generiert. Die Belichtungszeit für den Hellfeld-Modus wurde automatisch von dem Mikroskop eingestellt. Die Belichtungszeit für den TRITC-Kanal wurde zwischen 2 s und 5 s gewählt.

Die dargestellten Bilder wurden mit der Software OLYMPUS CELLSENSE von OLYMPUS visualisiert und bearbeitet. Dafür wurde je nach Intensität des Fluoreszenzsignals und des Fluoreszenzhintergrunds der Bereich der Graustufen gesetzt.

Die Bilder wurden mit der IMAGEJ-SOFTWARE ausgewertet. Dafür wurden diese in die Software geladen, jede Zelle im Hellfeld-Modus umrandet und das Histogramm des TRITC-Kanals für jede Zelle generiert. Es wurde anschließend ein Grenzwert von 5000 counts gesetzt und der Anteil der Pixel berechnet, die einen höheren Wert haben. Dies

wurde für 50-70 Zellen durchgeführt und der Mittelwert berechnet. Für manche Experimente wurde der ganze Prozess noch einmal wiederholt, sodass Fehlerbalken erhalten werden konnten.

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

ACN	Acetonitril
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ber	berechnet
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
BSA	Bovines Serumalbumin
CB[7]	Cucurbit[7]uril
Cbz	Benzyloxycarbonyl
Cil	Cilengitid
CID	<i>chemical inducer of dimerization</i>
CuAAC	<i>copper catalysed alkyne azide cycloaddition</i>
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en
DCM	Dichlormethan
DIC	Diisopropylcarbodiimid
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMF	Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECM	extrazelluläre Matrix
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia Coli</i>
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
ELISA	<i>enzym linked immunosorbent assay</i>
eq	<i>equivalent</i>
FAM	5,6-Carboxyfluorescein
FCS	fetales Kälberserum
FI	Fluoreszenzintensität
FKBP	FK506-bindende Proteine
Fmoc	Fluorenylmethoxycarbonyl
FRET	<i>förster resonance energy transfer</i>
gef	gefunden
Gal80	galactose/lactose metabolism regalutory protein
GOx	Glucose-Oxidase
GRB2	<i>growth factor receptor-bound protein 2</i>
HATU	<i>O</i> -(7-Azabenzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluronium-hexafluorophosphat
HFIP	Hexafluorisopropanol

7.1 Abkürzungsverzeichnis

HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HOAt	1-Hydroxy-7-azabenzotriazol
HPA	3-Hydroxypicolinsäure
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
HRP	<i>horse reddish peroxidase</i> (Meerrettichperoxidase)
mAb	monoklonaler Antikörper
LNA	<i>locked nucleic acid</i>
MALDI-TOF	<i>matrix assisted laser desorption/ionisation-time of flight</i>
MMP	Matrix-Metalloprotease
MS	Massenspektrometrie
Mtt	4-Methyltrityl
NBS	<i>N</i> -Bromsuccinimid
NCK	<i>cytoplasmatic protein</i>
NMP	<i>N</i> -Methyl-2-pyrrolidon
NMR	<i>nuclear magnetic resonance spectroscopy</i>
nt	Nukleotid
PB	Pyronin B
Pbf	2,2,4,6,7-Pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PDGF	Plazentaler Wachstumsfaktor
PNA	<i>peptide nucleic acid</i>
POI	<i>protein of interest</i>
RCA	<i>rolling circle amplification</i>
RhB	Rhodamin B
RTK	Rezeptor-Tyrosin-Kinase
SNARE	<i>soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor</i>
SPPS	<i>solid phase peptide synthesis</i>
SPR	Oberflächenplasmonenresonanzpektroskopie
TBS	<i>tris buffered saline</i>
TBTU	2-(1H-Benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethylaminium tetrafluoroborate
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphan
THAP	2',4',6'-Trihydroxyacetophenone
THPTA	Tris(3-hydroxypropyltriazolylmethyl)amine
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TFA	Trifluoressigsäure
TIS	Triisopropylsilan
TK	Tyrosin Kinase
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Trt	Trityl
UPLC	<i>ultra performance liquid chromatography</i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
VEGFR2	<i>vascular endothelial growth factor receptor</i>
XNA	Xenonukleinsäure

7.2 DNA-Sequenzen

In Tabelle 7 sind die in dieser Arbeit benutzten DNA-Komplexe dargestellt. Einfacherhalber werden die Komplexe in die jeweiligen DNA-Duplexe aufgespalten. Zum Beispiel wird bCA_{121} getrennt dargestellt, indem die CB[7]-Komponente bC_{21} und die Adaman-tan-Komponente bA_{21} separiert werden.

Tabelle 7: DNA-Sequenzen der eingesetzten Komplexe.

R_{mv}DNA
AGCTAGGCAGGTCGT---5'
RhB-TCGATCCGTCCAGCA---3'
R_{bv}DNA
AGCTAGGCAGGTCGT-RhB---5'
RhB-TCGATCCGTCCAGCA---3'
CD_{mv}DNA
CAGCCCGCGAGCGCG---5'
CD-GTCGGGCGCTCGCGC---3'
CD_{bv}DNA
CAGCCCGCGAGCGCG-CD---5'
CD-GTCGGGCGCTCGCGC---3'
mCB_a
CAGCCCGCGA-----CCTTGGCGGC---5'
GTCGGGCGCT-CB[7]·GGAACCGCG
mCB_b
CAGCCCGCGA--CCTTGGCGGC---5'
GTCGGGCGCT·GGAACCGCG-CB[7]---3'
bCB
CAGCCCGCGA-----CCTTGGCGGC---5'
GTCGGGCGCT-CB[7]·GGAACCGCG-CB[7]---3'
mCB_a k
CCTTGGCGGC---5'
GGAACCGCG-CB[7]---3'
mCB_a fl
CAGCCCGCGA----C---CCTTGGCGGC---5'
GTCGGGCGCT-CB[7]·GGAACCGCG---3'
mCB_b fl
CAGCCCGCGAGCCTTGGCGGC---5'
GTCGGGCGCT·GGAACCGCG-CB[7]---3'
mCB_a k/üh
ACCTTGGCGGC---5'
GGAACCGCG-CB[7]---3'
mAn_a
AGCTAGGCGC--CGCAGTCCGG---5'
Adn-TCGATCCGCG·GCGTCAGGCC---3'
mAn_b
AGCTAGGCGC-----CGCAGTCCGG---5'
TCGATCCGCG·Adn-GCGTCAGGCC---3'
bAn
AGCTAGGCGC-----CGCAGTCCGG---5'
Adn-TCGATCCGCG·Adn-GCGTCAGGCC---3'
mAn_a fl
AGCTAGGCGC-CCGAGTCCGG---5'
Adn-TCGATCCGCG·GCGTCAGGCC---3'
mAn_b fl
AGCTAGGCGC---C---CGCAGTCCGG---5'
TCGATCCGCG·Adn-GCGTCAGGCC---3'
30:bCB
CAGCCCGCGA-----CCTTGGCGGC-----TCCGGCCACG---5'
GTCGGGCGCT-CB[7]·GGAACCGCG-CB[7]·AGGCCGGTGC---3'

7.2 DNA-Sequenzen

30:mCB_a
CAGCCCGCGA-----CCTTGGCGGC-----TCCGGCCACG---5' GTCGGGCGCT · GGAACCGCCG- CB [7] · AGGCCGGTGC---3'
30:mCB_b
CAGCCCGCGA-----CCTTGGCGGC-----TCCGGCCACG---5' GTCGGGCGCT- CB [7] · GGAACCGCCG · AGGCCGGTGC---3'
30:bA2
GCGCACCGGT-----AGCTAGGCGC-----CGCAGTCCGG---5' CGCGTGGCCA · Adn -TCGATCCGCG · Adn -GCGTCAGGCC---3'
30:mA2_a
GCGCACCGGT--AGCTAGGCGC-----CGCAGTCCGG---5' CGCGTGGCCA · TCGATCCGCG · Adn -GCGTCAGGCC---3'
30:mA2_b
GCGCACCGGT-----AGCTAGGCGC--CGCAGTCCGG---5' CGCGTGGCCA · Adn -TCGATCCGCG · GCGTCAGGCC---3'
42:bCB
GCGTAAGGAGATCTGGAATGA-----ACTGGCCTATGTCAGTCAAAC---3' CB [7]-CGATTCTCTAGACCTTACT · CB [7]-TGACCGGATACAGTGACTTTG---5'
42:mCB_a
GCGTAAGGAGATCTGGAATGA-ACTGGCCTATGTCAGTCAAAC---3' CB [7]-CGATTCTCTAGACCTTACT · TGACCGGATACAGTGACTTTG---5'
42:mCB_b
GCGTAAGGAGATCTGGAATGA-----ACTGGCCTATGTCAGTCAAAC---3' CGATTCTCTAGACCTTACT · CB [7]-TGACCGGATACAGTGACTTTG---5'
42:bAd2
TGTGCAAACACCCAATGTCGT-----TAGTGTAGGTTCTGACCGATA---3' ACACGTTTGTGGGTACAGCA- Ad2 · ATCACATCCAAGACTGGCTAT- Ad2 ---5'
42:mAd2_a
TGTGCAAACACCCAATGTCGT--TAGTGTAGGTTCTGACCGATA---3' ACACGTTTGTGGGTACAGCA · ATCACATCCAAGACTGGCTAT- Ad2 ---5'
42:mAd2_b
TGTGCAAACACCCAATGTCGT-----TAGTGTAGGTTCTGACCGATA---3' ACACGTTTGTGGGTACAGCA- Ad2 · ATCACATCCAAGACTGGCTAT---5'
43:bCB
GCGTAAGGAGATCTGGAATGA---T---ACTGGCCTATGTCAGTCAAAC---3' CB [7]-CGATTCTCTAGACCTTACT · CB [7]-TGACCGGATACAGTGACTTTG---5'
43:mCB_a
GCGTAAGGAGATCTGGAATGATACTGGCCTATGTCAGTCAAAC---3' CB [7]-CGATTCTCTAGACCTTACT · TGACCGGATACAGTGACTTTG---5'
43:mCB_b
GCGTAAGGAGATCTGGAATGA---T---ACTGGCCTATGTCAGTCAAAC---3' CGATTCTCTAGACCTTACT · CB [7]-TGACCGGATACAGTGACTTTG---5'
43:bAd2
TGTGCAAACACCCAATGTCGT---T---TAGTGTAGGTTCTGACCGATA---3' ACACGTTTGTGGGTACAGCA- Ad2 · ATCACATCCAAGACTGGCTAT- Ad2 ---5'
43:mAd2_a
TGTGCAAACACCCAATGTCGTTAGTGTAGGTTCTGACCGATA---3' ACACGTTTGTGGGTACAGCA · ATCACATCCAAGACTGGCTAT- Ad2 ---5'
43:mAd2_b
TGTGCAAACACCCAATGTCGT---T---TAGTGTAGGTTCTGACCGATA---3' ACACGTTTGTGGGTACAGCA- Ad2 · ATCACATCCAAGACTGGCTAT---5'
DNA-ds1
GCGTAAGGAGATCTGGAATGAACTGGCCTATGTCAGTCAAAC---3' CGATTCTCTAG A CTTACTTGACCGGATACAGTGACTTTG---5'
CB-kontrolle1
GCGTAAGGAGATCTGGAATGAACTGGCCTATGTCAGTCAAAC---3' CB [7]-CGATTCTCTAGACCTTACT · TGACCGGATACAGTGACTTTG---5'
bC₂₁
Cy5-GCGTAAGGAGATCTGGAATGA-----ACTGGCCTATGTCAGTCAAAC-Cy5---3' CB [7]-CGATTCTCTAGACCTTACT · CB [7]-TGACCGGATACAGTGACTTTG---5'
mC_a
Cy5-GCGTAAGGAGATCTGGAATGA-ACTGGCCTATGTCAGTCAAAC-Cy5---3' CB [7]-CGATTCTCTAGACCTTACT · TGACCGGATACAGTGACTTTG---5'
bC_{22f}
Cy5-GCGTAAGGAGATCTGGAATGA---T---ACTGGCCTATGTCAGTCAAAC-Cy5---3' CB [7]-CGATTCTCTAGACCTTACT · CB [7]-TGACCGGATACAGTGACTTTG---5'
mC_b
Cy5-GCGTAAGGAGATCTGGAATGAT-ACTGGCCTATGTCAGTCAAAC-Cy5---3' CB [7]-CGATTCTCTAGACCTTACT · TGACCGGATACAGTGACTTTG---5'

7.2 DNA-Sequenzen

bC_{23f}
Cy5-GCGTAAGGAGATCTGGAATGA---TC---ACTGGCCTATGTCACCTGAAAC-Cy5---3' CB[7]-CGCATTCTCTAGACCTTACT · CB[7]-TGACCGGATACAGTGACTTTG---5'
mC_c
Cy5-GCGTAAGGAGATCTGGAATGATCACTGGCCTATGTCACCTGAAAC-Cy5---3' CB[7]-CGCATTCTCTAGACCTTACT · TGACCGGATACAGTGACTTTG---5'
bC₃₁
Cy5-GCGTAAGGAGATCTGGAATGAGTCCATATGG-----ACTGGCCTATGTCACCTGAAAC-Cy5---3' CB[7]-CGCATTCTCTAGACCTTACTCAGGTATACC · CB[7]-TGACCGGATACAGTGACTTTG---5'
bC₄₂
Cy5-GCGTAAGGAGATCTGGAATGA-GTCCATATGGCGCCATTGACG-----ACTGGCCTATGTCACCTGAAAC-Cy5---3' CB[7]-CGCATTCTCTAGACCTTACT · CAGGTATACCGCGGTAAGTGC · CB[7]-TGACCGGATACAGTGACTTTG---5'
mC_d
Cy5-GCGTAAGGAGATCTGGAATGA-GTCCATATGGCGCCATTGACG--ACTGGCCTATGTCACCTGAAAC-Cy5---3' CB[7]-CGCATTCTCTAGACCTTACT · CAGGTATACCGCGGTAAGTGC · TGACCGGATACAGTGACTTTG---5'
bC₆₃
Cy5-GCGTAAGGAGATCTGGAATGA-GTCCATATGGCGCCATTGACG · TGAGGCCGAATATCATGTGCA-- CB[7]-CGCATTCTCTAGACCTTACT · CAGGTATACCGCGGTAAGTGC-ACTCCGGCTTATAGTACACGT · -----ACTGGCCTATGTCACCTGAAAC-Cy5---3' CB[7]-TGACCGGATACAGTGACTTTG---5'
mC_e
Cy5---GCGTAAGGAGATCTGGAATGA-GTCCATATGGCGCCATTGACG · TGAGGCCGAATATCATGTGCA-- CB[7]-CGCATTCTCTAGACCTTACT · CAGGTATACCGCGGTAAGTGC-ACTCCGGCTTATAGTACACGT · -----ACTGGCCTATGTCACCTGAAAC-Cy5---3' TGACCGGATACAGTGACTTTG---5'
bC₈₄
Cy5-GCGTAAGGAGATCTGGAATGA-GTCCATATGGCGCCATTGACGTGCACATGAT · ATTGCGCTCATGAGGCCGAATATCATGTGCA-- CB[7]-CGCATTCTCTAGACCTTACT · CAGGTATACCGCGGTAAGTGCACGTGTACTA-TAAGCCGGAGTACTCCGGCTTATAGTACACGT · CB[7]- -----ACTGGCCTATGTCACCTGAAAC-Cy5---3' CB[7]-TGACCGGATACAGTGACTTTG---5'
bC₁₀₅
Cy5-GCGTAAGGAGATCTGGAATGA-GTCCATATGGCGCCATTGACG · CGGGAATTGGCCACGGACCTTTCAAGGGCTAAGGGCCGGTGC · CB[7]-CGCATTCTCTAGACCTTACT · CAGGTATACCGCGGTAAGTGC--GCCCTTAACCGGTGCGCTGGAAAGTTCCCGATTCCCGGCCACG- TGAGGCCGAATATCATGTGCA-----ACTGGCCTATGTCACCTGAAAC-Cy5-3' ACTCCGGCTTATAGTACACGT · CB[7]-TGACCGGATACAGTGACTTTG---5'
bAn₂₁
Cy3-TGTGCAAAACACCCAATGTCGT-----TAGTGTAGGTTCTGACCGATA-Cy3---3' ACACGTTTGTTGGGTTACAGCA-Adn · ATCACATCCAAGACTGGCTAT-Adn---5'
mAn_a
Cy3-TGTGCAAAACACCCAATGTCGT--TAGTGTAGGTTCTGACCGATA-Cy3---3' ACACGTTTGTTGGGTTACAGCA · ATCACATCCAAGACTGGCTAT-Adn---5'
bAn_{22f}
Cy3-TGTGCAAAACACCCAATGTCGT---C---TAGTGTAGGTTCTGACCGATA-Cy3---3' ACACGTTTGTTGGGTTACAGCA-Adn · ATCACATCCAAGACTGGCTAT-Adn---5'
mA1_b
Cy3-TGTGCAAAACACCCAATGTCGT--C--TAGTGTAGGTTCTGACCGATA-Cy3---3' ACACGTTTGTTGGGTTACAGCA · ATCACATCCAAGACTGGCTAT-Adn---5'
bAn_{23f}
Cy3-TGTGCAAAACACCCAATGTCGT--CC---TAGTGTAGGTTCTGACCGATA-Cy3---3' ACACGTTTGTTGGGTTACAGCA-Adn · ATCACATCCAAGACTGGCTAT-Adn---5'
mA1_c
Cy3-TGTGCAAAACACCCAATGTCGT-CC-TAGTGTAGGTTCTGACCGATA-Cy3---3' ACACGTTTGTTGGGTTACAGCA · ATCACATCCAAGACTGGCTAT-Adn---5'
bAn₃₁
Cy3-TGTGCAAAACACCCAATGTCGTACGCGGTACC-----TAGTGTAGGTTCTGACCGATA-Cy3---3' ACACGTTTGTTGGGTTACAGCATGCGCCATGG-Adn · ATCACATCCAAGACTGGCTAT-Adn---5'
bAn₄₂
Cy3-TGTGCAAAACACCCAATGTCGT-----ACGCGGTACCAGGCTACTAAG--TAGTGTAGGTTCTGACCGATA-Cy3---3' ACACGTTTGTTGGGTTACAGCA-Adn · TGCGCCATGGTCCGATGATTC · ATCACATCCAAGACTGGCTAT-Adn---5'
mA1_d
Cy3-TGTGCAAAACACCCAATGTCGT--ACGCGGTACCAGGCTACTAAG--TAGTGTAGGTTCTGACCGATA-Cy3---3' ACACGTTTGTTGGGTTACAGCA · TGCGCCATGGTCCGATGATTC · ATCACATCCAAGACTGGCTAT-Adn---5'
bAn₆₃
Cy3-TGTGCAAAACACCCAATGTCGT-----ACGCGGTACCTAGTGTAGGTTCTGACCGATA · CGTAGTAATCTTGCGCGTACG-- ACACGTTTGTTGGGTTACAGCA-Adn · TGCGCCATGGATCACATCCAAGACTGGCTAT-GCATCATTAGAACGCGCATGC · TAGTGTAGGTTCTGACCGATA-Cy3---3' ATCACATCCAAGACTGGCTAT-Adn---5'
mA1_e
Cy3-TGTGCAAAACACCCAATGTCGT---ACGCGGTACCTAGTGTAGGTTCTGACCGATA · CGTAGTAATCTTGCGCGTACG-- ACACGTTTGTTGGGTTACAGCA · TGCGCCATGGATCACATCCAAGACTGGCTAT-GCATCATTAGAACGCGCATGC · TAGTGTAGGTTCTGACCGATA-Cy3 ATCACATCCAAGACTGGCTAT-Adn---5'

7.2 DNA-Sequenzen

bA1₈₄
Cy3-TGTGCAAAACACCCAATGTCGT-----ACGCGGTACCAGGCTACTAAGCGTAGCCGCAA·GATTACTACGCGTAGTAATCTTGCGCGTACG--- ACACGTTTGTGGGTTACAGCA- Adn ·TGCGCCATGGTCCGATGATTCGCATCGGCGTT—CTAATGATGCGCATCATTAGAACGCGCATGC· -TAGTGTAGGTTCTGACCGATA-Cy3---3' ATCACATCCAAGACTGGCTAT- Adn ---5'
bA1₁₀₅
Cy3-TGTGCAAAACACCCAATGTCGT-----ACGCGGTACCAGGCTACTAAG·GCTAGCCGTAAGTCATTGCACCCGGTAACCTCCATGCCGACT· ACACGTTTGTGGGTTACAGCA- Adn TGCGCCATGGTCCGATGATTC—CGATCGGCATTAGTAACGTGGGCCATTGAGGTACGGCCTGA- CGTAGTAATCTTGCGCGTACG--TAGTGTAGGTTCTGACCGATA-Cy3---3' GCATCATTAGAACGCGCATGC·ATCACATCCAAGACTGGCTAT- Adn ---5'
clC₂₁
GCGTAAGGAGATCTGGAATGA-----ACTGGCCTATGTCACTGAAAC---3' CB[7] -CGCATTCTCTAGACCTTACT· CB[7] -TGACCGGATACAGTGACTTTG---5'
clC_{23f}
GCGTAAGGAGATCTGGAATGA--TC---ACTGGCCTATGTCACTGAAAC---3' CB[7] -CGCATTCTCTAGACCTTACT· CB[7] -TGACCGGATACAGTGACTTTG---5'
clC₆₃
GCGTAAGGAGATCTGGAATGA-GTCCATATGGCGCCATTGACG·TGAGGCCGAATATCATGTGCA----- CB[7] -CGCATTCTCTAGACCTTACT·CAGGTATACCGCGGTAAGTGC-ACTCCGGCTTATAGTACACGT· ---ACTGGCCTATGTCACTGAAAC---3' CB[7] -TGACCGGATACAGTGACTTTG---5'
clC_{86f}
GCGTAAGGAGATCTGGAATGA-GTCCATATGGCGCCATTGACGTGCATGAT----ATTGGCCTCATGAGGCCGAATATCATGTGCA----- CB[7] -CGCATTCTCTAGACCTTACT·CAGGTATACCGCGGTAAGTGCACGTGTACTA-TCCAAGCCGGAGTACTCCGGCTTATAGTACACGT· -----ACTGGCCTATGTCACTGAAAC---3' CB[7] -TGACCGGATACAGTGACTTTG---5'
clAn₂₁
Cy3-TGTGCAAAACACCCAATGTCGT-----TAGTGTAGGTTCTGACCGATA-Cy5---3' ACACGTTTGTGGGTTACAGCA- Adn ·ATCACATCCAAGACTGGCTAT- Adn ---5'
clAn_{23f}
Cy3-TGTGCAAAACACCCAATGTCGT---CC--TAGTGTAGGTTCTGACCGATA-Cy5---3' ACACGTTTGTGGGTTACAGCA- Adn ·ATCACATCCAAGACTGGCTAT- Adn ---5'
clAn₆₃
Cy3-TGTGCAAAACACCCAATGTCGT-----ACGCGGTACCTAGTGTAGGTTCTGACCGATA·CGTAGTAATCTTGCGCGTACG-- ACACGTTTGTGGGTTACAGCA- Adn ·TGCGCCATGGATCACATCCAAGACTGGCTAT-GCATCATTAGAACGCGCATGC· TAGTGTAGGTTCTGACCGATA-Cy5---3' ATCACATCCAAGACTGGCTAT- Adn ---5'
clAn₈₄
Cy3-TGTGCAAAACACCCAATGTCGT-----ACGCGGTACCAGGCTACTAAGCGTAGCCGCAA·GATTACTACGCGTAGTAATCTTGCGCGTACG--- ACACGTTTGTGGGTTACAGCA- Adn ·TGCGCCATGGTCCGATGATTCGCATCGGCGTT—CTAATGATGCGCATCATTAGAACGCGCATGC· TAGTGTAGGTTCTGACCGATA-Cy5---3' ATCACATCCAAGACTGGCTAT- Adn ---5'
clAn_{86f}
Cy3-TGTGCAAAACACCCAATGTCGT-----ACGCGGTACCAGGCTACTAAGCGTAGCCGCAA·G----ATTACTACGCGTAGTAATCTTGCGCGTACG--- ACACGTTTGTGGGTTACAGCA- Adn ·TGCGCCATGGTCCGATGATTCGCATCGGCGTT---CGGTAATGATGCGCATCATTAGAACGCGCATGC· TAGTGTAGGTTCTGACCGATA-Cy5---3' ATCACATCCAAGACTGGCTAT- Adn ---5'
Cy5-DNAds 42
Cy5·GCGTAAGGAGATCTGGAATGA-ACTGGCCTATGTCACTGAAAC-Cy5---3' CGCATTCTCTAGACCTTACT·TGACCGGATACAGTGACTTTG---5'
Cy5-42mer-Cy3
Cy3-TGTGCAAAACACCCAATGTCGTTAGTGTAGGTTCTGACCGATA-Cy5---3'
Cy3-42mer-Cy5
Cy5-TGTGCAAAACACCCAATGTCGTTAGTGTAGGTTCTGACCGATA-Cy3---3'
Complementary-DNA-42
TATCGGTCAGAACCTACACTAACGACATTGGGTGTTTCGACA---3'
Connector-DNA-42
ACGCAATTGGGTGTTTGACATATCGGTCAGAACCTACACTA---3'
T₂₁
Cy3-TGTGCAAAACACCCAATGTCGT-----TAGTGTAGGTTCTGACCGATA-Cy3---3'
T₆₃ a
Cy3-TGTGCAAAACACCCAATGTCGT-----ACGCGGTACCTAGTGTAGGTTCTGACCGATA---3'
mP1
Atto565-CTGGCCTATGTCACTGAAAC-C--GCGTAAGGAGATCTGGAATGA---3' TGACCGGATGCAGTGACTTTG· P1 -CGCATTCTCTAGACCTTACT---5'
bP1
Atto565-CTGGCCTATGTCACTGAAAC-C--GCGTAAGGAGATCTGGAATGA---3' P1 -TGACCGGATGCAGTGACTTTG· P1 -CGCATTCTCTAGACCTTACT---5'
bP2
Atto565-CTGGCCTATGTCACTGAAAC-C--GCGTAAGGAGATCTGGAATGA---3' TGACCGGATGCAGTGACTTTG· P2 -CGCATTCTCTAGACCTTACT---5'

7.2 DNA-Sequenzen

bP1C
Atto565- ACTGGCCTATGTC ACTGAAAC-C--GCGTAAGGAGATCTGGAATGA--C--GTCGAGCTCCATAATAAGCG---3' P1-TGACCGGATGCAGTGACTTTG · P1-CGCATTCTCTAGACCTTACT · Cii-CAGCTCGAGGTATTATTTCGC---5'
bP2C
Atto565- ACTGGCCTATGTC ACTGAAAC-C--GCGTAAGGAGATCTGGAATGA--C--GTCGAGCTCCATAATAAGCG---3' TGACCGGATGCAGTGACTTTG · P2-CGCATTCTCTAGACCTTACT · Cii-CAGCTCGAGGTATTATTTCGC---5'
C
Atto565- ACTGGCCTATGTC ACTGAAAC--CGCGTAAGGAGATCTGGAATGA--C--GTCGAGCTCCATAATAAGCG---3' TGACCGGATGCAGTGACTTTG · CGCATTCTCTAGACCTTACT · Cii-CAGCTCGAGGTATTATTTCGC---5'
bP2₁
Atto565- GCGTAAGGAGATCTGGAATGACGTCGAGCTCCATAATAAGCG---3' P2-CGCATTCTCTAGACCTTACT · CAGCTCGAGGTATTATTTCGC---5'
bP2C₀
Atto565- GCGTAAGGAGATCTGGAATGA-----GTCGAGCTCCATAATAAGCG---3' P2-CGCATTCTCTAGACCTTACT · Cii-CAGCTCGAGGTATTATTTCGC---5'
bP2C₁
Atto565- GCGTAAGGAGATCTGGAATGA--C--GTCGAGCTCCATAATAAGCG---3' P2-CGCATTCTCTAGACCTTACT · Cii-CAGCTCGAGGTATTATTTCGC---5'
bP2C₅
Atto565- GCGTAAGGAGATCTGGAATGACTCCGGTCGAGCTCCATAATAAGCG---3' P2-CGCATTCTCTAGACCTTACT · Cii-CAGCTCGAGGTATTATTTCGC---5'
C₁
Atto565- GCGTAAGGAGATCTGGAATGA--C--GTCGAGCTCCATAATAAGCG---3' CGCATTCTCTAGACCTTACT · Cii-CAGCTCGAGGTATTATTTCGC---5'
P2C₂₁
GCGTAAGGAGATCTGGAATGA-----GTCGAGCTCCATAATAAGC---3' P2-CGCATTCTCTAGACCTTACT · Cii-CAGCTCGAGGTATTATTTCGC---5'
P2C₄₂
GCGTAAGGAGATCTGGAATGA-ACACACACTTTACCGCAACTA-----GTCGAGCTCCATAATAAGC---3' P2-CGCATTCTCTAGACCTTACT · TGTGTGAGAAATGGCGTTGAT · Cii-CAGCTCGAGGTATTATTTCGC---5'
P2C₆₃
GCGTAAGGAGATCTGGAATGA-ACACACACTTTACCGCAACTACACCTAGCTGAGATACTCCA-----GTCGAGCTCCATAATAAGC---3' P2-CGCATTCTCTAGACCTTACT · TGTGTGAGAAATGGCGTTGATGTGGATCGACTCTATCAGGGT · Cii-CAGCTCGAGGTATTATTTCGC---5'
P2+C
GCGTAAGGAGATCTGGAATGA---3' + GTCGAGCTCCATAATAAGC---3' P2-CGCATTCTCTAGACCTTACT---5' Cii-CAGCTCGAGGTATTATTTCGC---5'

7.3 Statistische Mechanik: Berechnungen zur Konzentrationsabhängigkeit des Bivalenten Effekts bei Verdrängungsexperimenten

Um den Einfluss der Rezeptorkonzentration auf den bivalenten Effekt zu untersuchen, werden die IC50-Werte von monovalenten und bivalenten Liganden verglichen. Einfacher halber werden nur die bimolekularen Interaktionen zwischen Liganden und Rezeptoren betrachtet, das heißt, nur ein Ligand kann einen Rezeptor binden. Multimolekulare Wechselwirkungen werden in diesen Berechnungen nicht betrachtet. Weiterhin werden Bindungspermutationen nicht berücksichtigt, da hier nur der Unterschied der IC50-Werte von monovalenten und bivalenten Systemen von Interesse ist.

Zunächst soll ein Ausdruck für den IC50-Wert eines monovalenten Liganden hergeleitet werden. Die gesamte oder auch totale Rezeptorkonzentration $[R]_{tot}$ setzt sich aus der Summe der Konzentrationen der freien Rezeptoren $[R]$ und der gebundenen Rezeptoren $[RM]$ zusammen, wobei M für den monovalenten Liganden steht.

$$[R]_{tot} = [R] + [RM] \quad (15)$$

Die Dissoziationskonstante K_m für einen Komplex aus dem Rezeptor und dem monovalenten Liganden ist definiert als:

$$K_m = \frac{[R][M]}{[RM]} \quad (16)$$

Also ergibt sich für die Rezeptorkonzentration der folgende Ausdruck:

$$[R]_{tot} = [R] + \frac{[R][M]}{K_m} \quad (17)$$

Analog dazu, ergibt sich die vollständige (totale) Konzentration von monovalenten Liganden $[M]_{tot}$ aus der Summe der Konzentrationen der freien monovalenten Liganden $[M]$ und der gebundenen monovalenten Liganden $[RM]$, welche äquivalent zu der Konzentration der gebundenen Rezeptoren ist. Daraus lässt sich folgender Ausdruck für die totale Konzentration der monovalenten Liganden ableiten:

$$[M]_{tot} = [M] + [RM] = [M] + \frac{[R][M]}{K_m} \quad (18)$$

Aus Gleichung 17 und 18 ergibt sich das folgende Verhältnis zwischen der totalen Rezeptorkonzentration und der totalen Ligandenkonzentration:

$$[R]_{tot} = [R] \left(1 + \frac{[M]_{tot}}{K_m(1 + [R]/K_m)} \right) \quad (19)$$

Der IC50-Wert wird als die totale Ligandenkonzentration, bei der die Hälfte aller Rezeptoren gebunden sind definiert, oder auch die Konzentration, bei der die Hälfte der Rezeptoren nicht gebunden sind: $[R] = [R]_{tot}/2$. Wird dies in Gleichung 19 eingefügt, so wird der folgende Ausdruck für die totale Rezeptorkonzentration erhalten:

$$[R]_{tot} = \frac{[R]_{tot}}{2} \left(1 + \frac{[M]_{tot}}{K_m(1 + [R]/K_m)} \right) \quad (21)$$

Wobei $[M]_{tot}$ äquivalent zum IC50-Wert ist. Durch Gleichung 20 kann der folgende Ausdruck für den monovalenten IC50-Wert erhalten werden:

$$IC50_{mono} = K_m \left(1 + \frac{[R]_{tot}}{2K_m} \right) \quad (22)$$

Auf gleiche Weise wird ein Ausdruck für den bivalenten IC50-Wert erhalten, wenn nur die monovalenten Dissoziationskonstante K_m durch die bivalenten Dissoziationskonstante K_b ersetzt wird:

$$IC50_{bi} = K_b \left(1 + \frac{[R]_{tot}}{2K_{bi}} \right) \quad (23)$$

Aus Gleichung 22 und 23 kann gefolgert werden, dass der IC50-Wert nur dann dem Wert der Dissoziationskonstante gleicht, wenn die totale Rezeptorkonzentration viel kleiner als die Dissoziationskonstante ist ($[R]_{tot} \ll K_m$ und $[R]_{tot} \ll K_b$).

Um den Einfluss der Rezeptorkonzentration zu illustrieren, wird ein System mit einer monovalenten Dissoziationskonstante von $K_m = 1 \mu\text{M}$ angenommen. Die bivalente Dissoziationskonstante ergibt sich dann durch die Gleichung: $K_b = K_m^2/C_{\text{eff}}$, mit C_{eff} als effektive Konzentration. Für rigide Systeme mit einem nanometer-großen Gerüst, liegt die effektive Konzentration im millimolaren Bereich.²⁶ Bei einer effektiven Konzentration von 1 mM, ergibt sich für die bivalente Dissoziationskonstante K_b ein Wert von 1 nM.

Um die Ergebnisse graphisch zu illustrieren, wurde das Verhalten der IC₅₀-Werte für monovalente und bivalente Interaktionen in Abhängigkeit der totalen Rezeptorkonzentration in einem piko- bis millimolaren Bereich aufgetragen (Abbildung 76). Die Abbildung zeigt, dass bei großen Rezeptorkonzentrationen im millimolaren Bereich kein Unterschied der IC₅₀-Werte zwischen monovalenten und bivalenten Interaktionen vorliegt. Wenn die Rezeptorkonzentration verringert wird (mikromolarer Bereich), dann ist der Unterschied zwischen den IC₅₀-Werten für monovalente und bivalente Systeme geringer als eine Größenordnung. Der größte Unterschied der IC₅₀-Werte kann beobachtet werden, wenn die Rezeptorkonzentration im nanomolaren Bereich vorliegt.

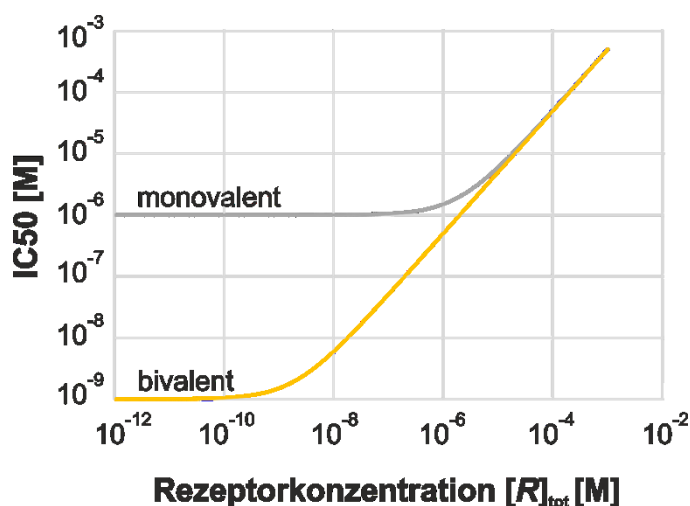


Abbildung 76: IC₅₀-Wert in Abhängigkeit der Rezeptorkonzentration $[R]_{\text{tot}}$. Blaue Linie: Monovalente IC₅₀-Werte, rote Linie: bivalente IC₅₀-Werte. Monovalente Bindungskonstante $K_m = 1 \mu\text{M}$, effektive Konzentration: $c_{\text{eff}} = 1 \text{ mM}$.

Die theoretische Betrachtungsweise der IC₅₀-Werte in Abhängigkeit der Rezeptorkonzentration zeigt, dass der Unterschied der IC₅₀-Werte der monovalenten und bivalenten Interaktionen von der Rezeptorkonzentration abhängt. Ist diese zu hoch, kann kein bivalenter Effekt beobachtet werden. In Kapitel 4.1.8 wurde die Dissoziationskonstante der monovalenten Interaktion von CB[7]-DNA-Komplexen und

Ad2-DNA-Komplexen bestimmt. Diese beträgt 700 nM. Das bedeutet, dass die in den Kapiteln 4.1.6 und 4.1.7 verwendeten Rezeptorkonzentrationen zu hoch sein müssten, um eine bivalente Verstärkung zu beobachten. Allerdings war es nicht möglich, die Messungen bei geringeren Konzentrationen durchzuführen, da bei mikromolarer Affinität der Farbstoffe für den CB[7]-DNA-Komplex die durch Verdrängung bewirkte Änderung des Fluoreszenzsignals zu gering wäre, um vom Hintergrundsignal unterscheidbar zu sein. Ein Farbstoff, der deutlich stärker an das CB[7] bindet und bei dem eine starke Änderung des Emissionsmaximums bei der Bindung hervorgerufen wird, ist nicht literaturbekannt.

Theoretisch könnte ein Verdränger geringerer Affinität eingesetzt werden. Dabei würden allerdings höhere Konzentrationen des Verdrängungsliganden benötigt. Wie bereits in Kapitel 4.1.5 erwähnt, führt dies zu unerwünschten Interaktionen mit den Farbstoffen.

7.4 Charakterisierung von DNA, Peptiden und Peptidmimetika

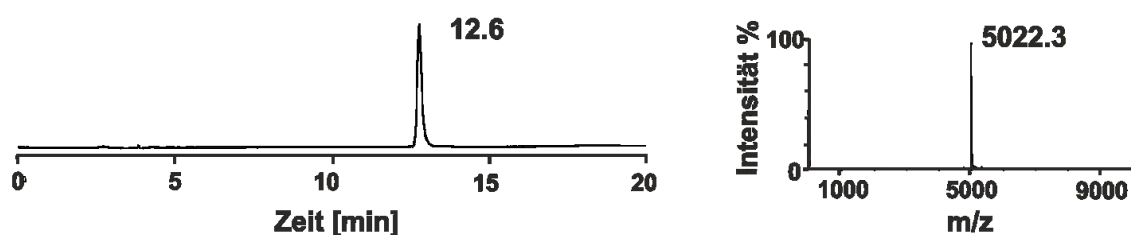
7.4.1 Charakterisierung von β -Cyclodextrin modifizierter DNA

5'- TrtS- GTC GGG CGC TCG CGC-3' **TrtS-1**

$OD_{260} = 56.8$ (437 nmol, 44%), $\epsilon_{260} = 129800 \text{ L} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

HPLC: $t_R = 12.6$ min (0-50 ACN in 0.1 M TEAA in 15 min, 260 nm)

MALDI-TOF (m/z): ber.: 5024.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$; gef.: 5022.3

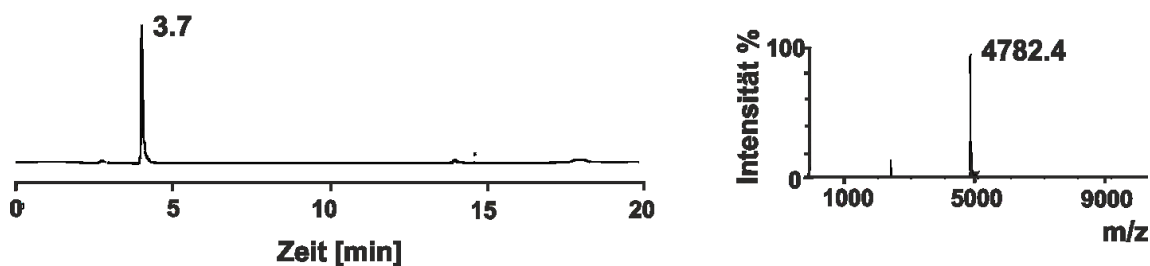


5'- SH- GTC GGG CGC TCG CGC-3' **SH-1**

$OD_{260} = 48.9$ (377 nmol, 86%), $\epsilon_{260} = 129800 \text{ L} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

HPLC: $t_R = 3.7$ min (0-50 ACN in 0.1 M TEAA in 15 min, 260 nm)

MALDI-TOF (m/z): ber.: 4781.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$; gef.: 4782.4

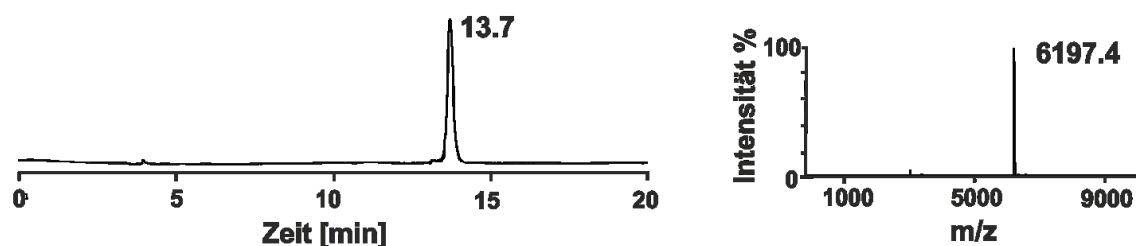


5'- SH- GTC GGG CGC TCG CGC-3' **CD-1**

$OD_{260} = 41.6$ (320 nmol, 84%), $\epsilon_{260} = 129800 \text{ L} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

HPLC: $t_R = 13.7$ min (0-50 ACN in 0.1 M TEAA in 15 min, 260 nm)

MALDI-TOF (m/z): ber.: 6107.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$; gef.: 6107.4

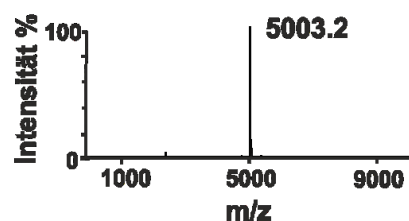
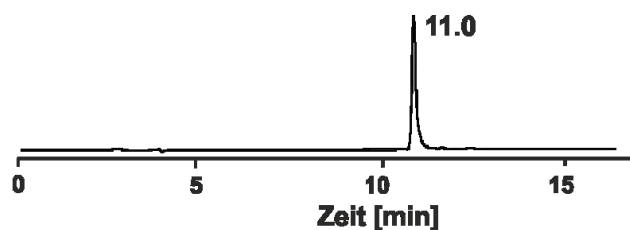


5'-TrtS- GCG CGA GCG CCC GAC-3 STt-2

$OD_{260} = 66.0$ (487 nmol, 49%), $\epsilon_{260} = 135500 \text{ L} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

HPLC: $t_R = 11.0$ min (0-50 ACN in 0.1 M TEAA in 10 min, 260 nm)

MALDI-TOF (m/z): ber.: 5002.2 $[M+H]^+$; gef.: 5003.2

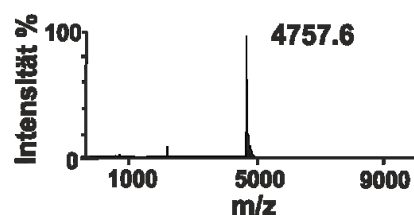
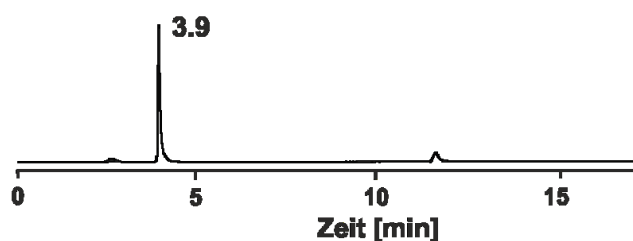


5'-SH- GCG CGA GCG CCC GAC-3 SH-2

$OD_{260} = 53.5$ (402 nmol, 83%), $\epsilon_{260} = 135500 \text{ L} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

HPLC: $t_R = 11.0$ min (0-50 ACN in 0.1 M TEAA in 13 min, 260 nm)

MALDI-TOF (m/z): ber.: 4759.1 $[M+H]^+$; gef.: 4757.6

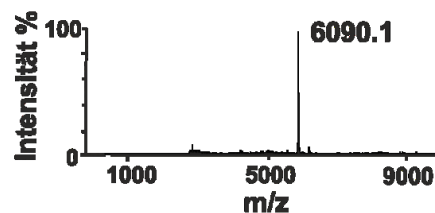
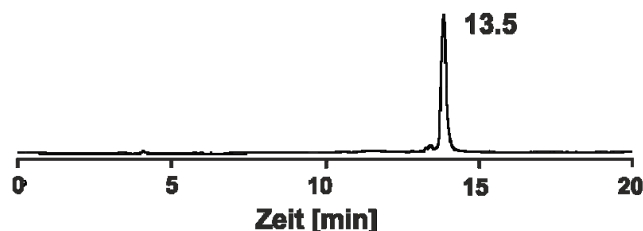


5'-CD- GCG CGA GCG CCC GAC-3 CD-2

$OD_{260} = 49.7$ (367 nmol, 91%), $\epsilon_{260} = 135500 \text{ L} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

HPLC: $t_R = 11.0$ min (0-50 ACN in 0.1 M TEAA in 15 min, 260 nm)

MALDI-TOF (m/z): ber.: 6085.1 $[M+H]^+$; gef.: 6090.1



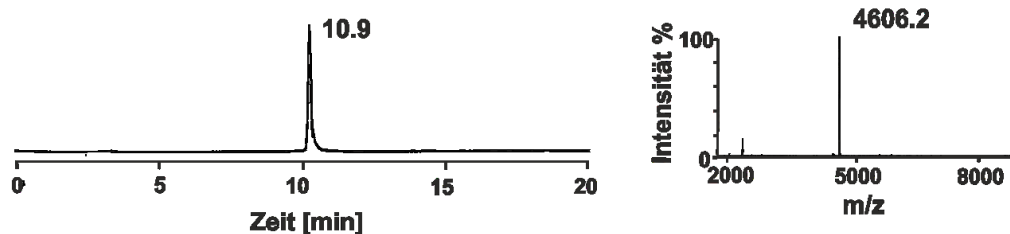
7.4.2 Charakterisierung von CB[7]-modifizierter DNA

5'- GTC GGG CGC T-CB-3' **CB-1**

$OD_{260} = 22.1$ (249 nmol, 75%), $\epsilon_{260} = 88900 \text{ L} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

HPLC: $t_R = 10.9$ min (0-50 ACN in 0.1 M TEAA in 15 min, 260 nm)

MALDI-TOF (m/z): ber.: 4606.3 $[M+H]^+$; gef.: 4606.2

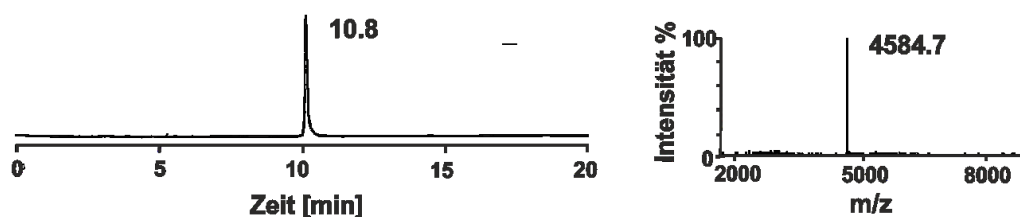


5'- GGA ACC GCC G-CB-3' **CB-2**

$OD_{260} = 20.1$ (212 nmol, 71%), $\epsilon_{260} = 94800 \text{ L} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

HPLC: $t_R = 10.8$ min (0-50 ACN in 0.1 M TEAA in 15 min, 260 nm)

MALDI-TOF (m/z): ber.: 4584.5 $[M+H]^+$; gef.: 4584.7

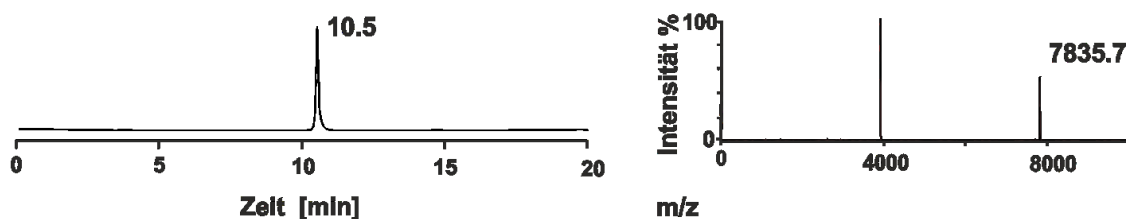


5'-TCATTCCAGATCTCCTTACGC-CB-3' **CB-3**

$OD_{260} = 22.8$ (121 nmol, 61%), $\epsilon_{260} = 187800 \text{ L} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

HPLC: $t_R = 10.5$ min (0-50 ACN in 0.1 M TEAA in 15 min, 260 nm)

MALDI-TOF (m/z): ber.: 7838.1 $[M+H]^+$; gef.: 7835.7

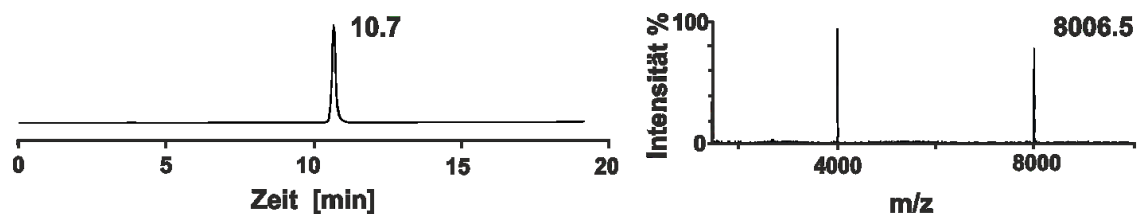


5'-GTTTCAGTGACATAGGCCAGT-CB-3' CB-4

$OD_{260} = 28.7$ (139 nmol, 70%), $\epsilon_{260} = 206200 \text{ L} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

HPLC: $t_R = 10.7 \text{ min}$ (0-50 ACN in 0.1 M TEAA in 15 min, 260 nm)

MALDI-TOF (m/z): ber.: 8007.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$; gef.: 8006.5

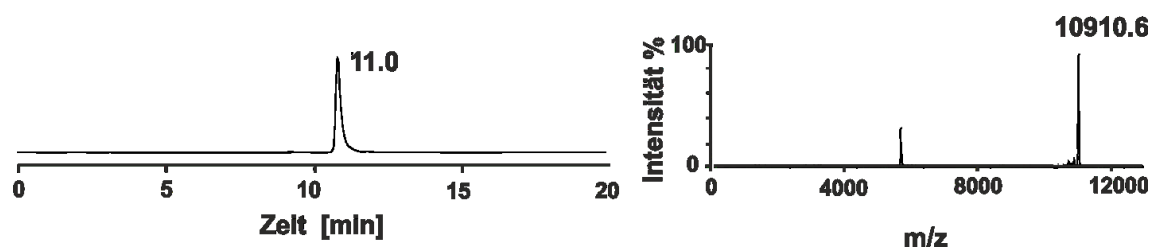


5'-CCATATGGACTCATTCCAGATCTCCTTACGC-CB-3' CB-5

$OD_{260} = 23.4$ (82 nmol, 41%), $\epsilon_{260} = 284700 \text{ L} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

HPLC: $t_R = 11.0 \text{ min}$ (0-50 ACN in 0.1 M TEAA in 15 min, 260 nm)

MALDI-TOF (m/z): ber.: 10912.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$; gef.: 10919.6



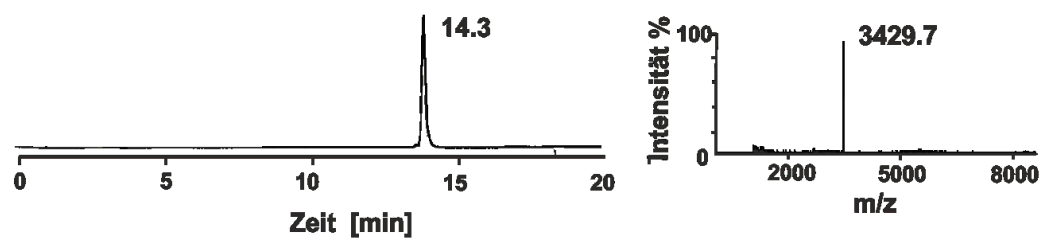
7.4.4 Charakterisierung von Adamantyl-modifizierter DNA

5'-Ad1-TCGATCCGCG-3' Ad1-1

$OD_{260} = 18.9$ (210 nmol, 21%), $\epsilon_{260} = 89900 \text{ L} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

HPLC: $t_R = 14.3 \text{ min}$ (0-50 ACN in 0.1 M TEAA in 15 min, 260 nm)

MALDI-TOF (m/z): ber.: 3429.5 $[\text{M}+\text{H}]^+$; gef.: 3429.7

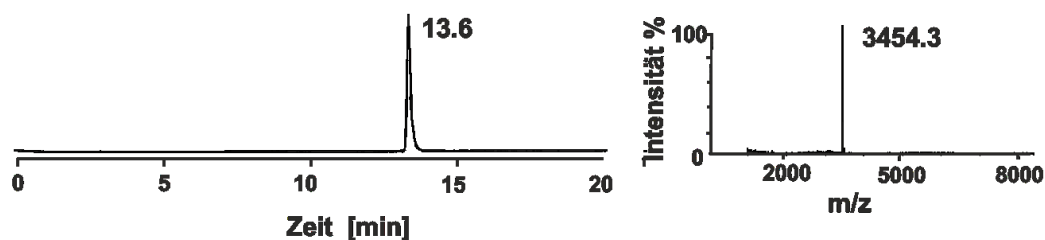


5'-Ad1-GCGTCAGGCC-3' Ad1-2

$OD_{260} = 18.8$ (207 nmol, 21%), $\epsilon_{260} = 91000 \text{ L} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

HPLC: $t_R = 13.6 \text{ min}$ (0-50 ACN in 0.1 M TEAA in 15 min, 260 nm)

MALDI-TOF (m/z): ber.: 3454.5 $[\text{M}+\text{H}]^+$; gef.: 3454.3

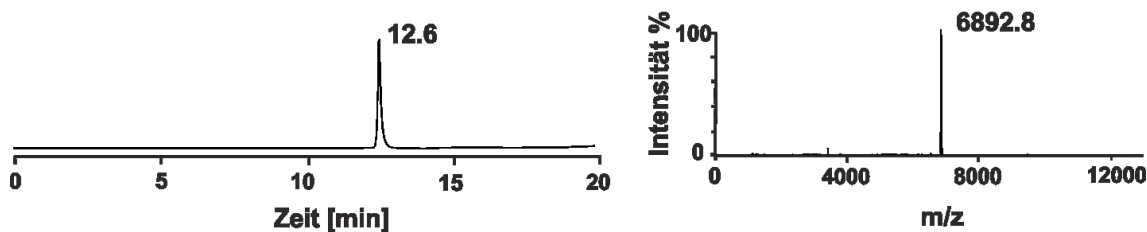


5'-Ad1-ACGACATTGGGTGTTTGCACA-3' Ad1-3

$OD_{260} = 30.7$ (150 nmol, 15%), $\epsilon_{260} = 204400 \text{ L} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

HPLC: $t_R = 12.6 \text{ min}$ (0-50 ACN in 0.1 M TEAA in 15 min, 260 nm)

MALDI-TOF (m/z): ber.: 6887.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$; gef.: 6892.8

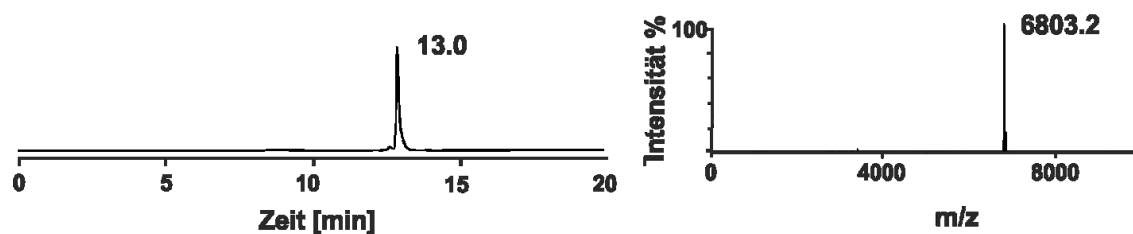


5'-Ad1-TATCGGTCAGAACCTACACTA-3' Ad1-4

$OD_{260} = 32.8$ (158 nmol, 16%), $\epsilon_{260} = 207500 \text{ L} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

HPLC: $t_R = 13.0 \text{ min}$ (0-50 ACN in 0.1 M TEAA in 15 min, 260 nm)

MALDI-TOF (m/z): ber.: 6758.2 $[M+H]^+$; gef: 6761.8

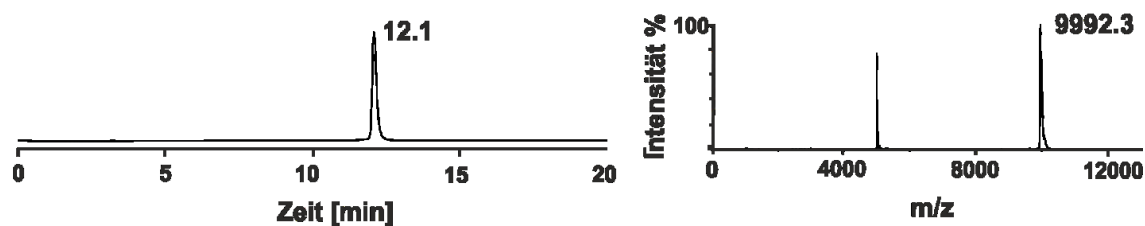


5'-Ad1-GGTACCGCGTACGACATTGGGTGTTTGCACA-3' Ad1-5

$OD_{260} = 31.0$ (104 nmol, 10%), $\epsilon_{260} = 297300 \text{ L} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

HPLC: $t_R = 12.1 \text{ min}$ (0-50 ACN in 0.1 M TEAA in 15 min, 260 nm)

MALDI-TOF (m/z): ber.: 9993.2 $[M+H]^+$; gef.: 9992.3

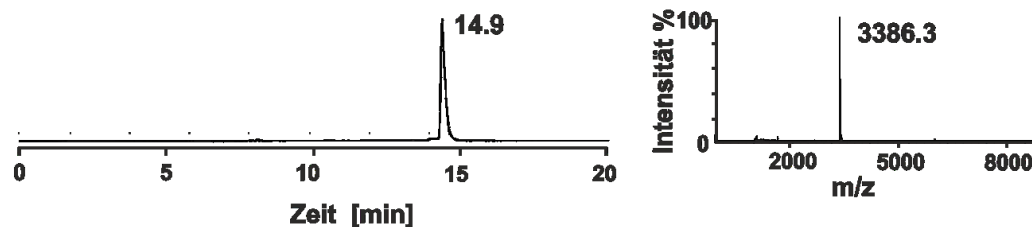


5'-Ad2-TCGATCCGCG-3' Ad2-1

$OD_{260} = 22.0$ (245 nmol, 25%), $\epsilon_{260} = 89900 \text{ L} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

HPLC: $t_R = 14.9 \text{ min}$ (0-60 ACN in 0.1 M TEAA in 15 min, 260 nm)

MALDI-TOF (m/z): ber.: 3386.5 [M+H]⁺; gef.: 3386.3

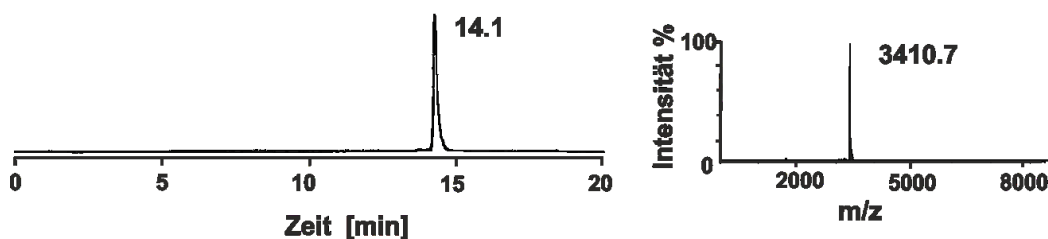


5'-Ad2-GCGTCAGGCC-3' Ad2-2

$OD_{260} = 20.1$ (221 nmol, 22%), $\epsilon_{260} = 91000 \text{ L} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

HPLC: $t_R = 14.1 \text{ min}$ (0-60 ACN in 0.1 M TEAA in 15 min, 260 nm)

MALDI-TOF (m/z): ber.: 3411.5 [M+H]⁺; gef.: 3410.7

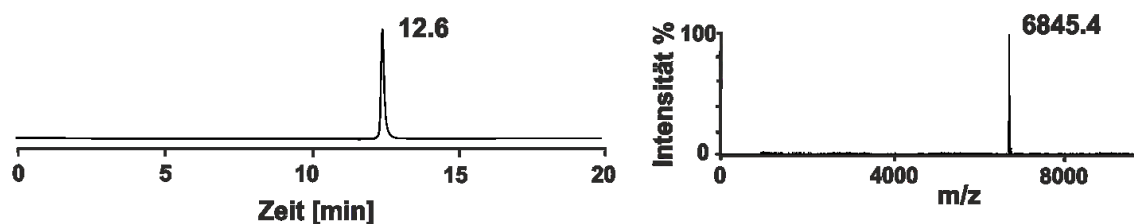


5'-Ad2-ACGACATTGGGTGTTTGCACA-3' Ad2-3

$OD_{260} = 29.2$ (143 nmol, 14%), $\epsilon_{260} = 204400 \text{ L} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

HPLC: $t_R = 12.6 \text{ min}$ (0-50 ACN in 0.1 M TEAA in 15 min, 260 nm)

MALDI-TOF (m/z): ber.: 6843.2 [M+H]⁺; gef.: 6845.4

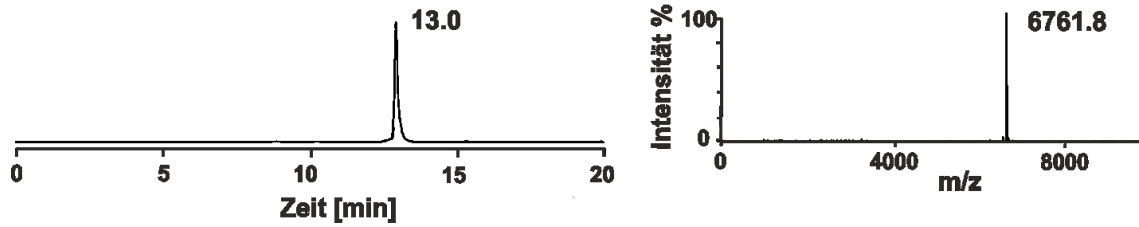


5'-Ad2-TATCGGTCAGAACCTACACTA-3' Ad2-4

$OD_{260} = 29.5$ (142 nmol, 14%), $\epsilon_{260} = 207500 \text{ L} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

HPLC: $t_R = 13.0 \text{ min}$ (0-50 ACN in 0.1 M TEAA in 15 min, 260 nm)

MALDI-TOF (m/z): ber.: 6758.2 $[M+H]^+$; gef.: 6761.8

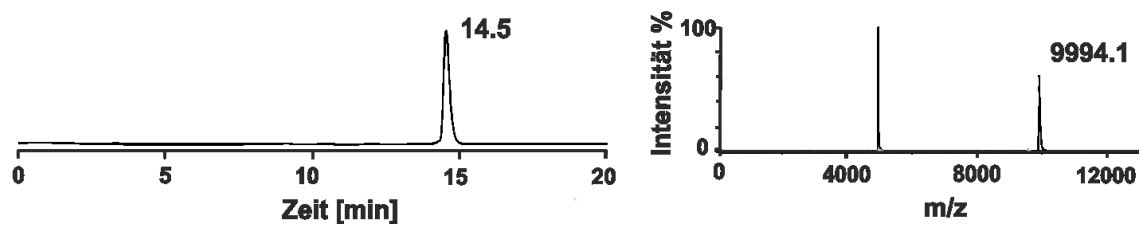


5'-Ad2-GGTACCGCGTACGACATTGGGTGTTTGCACA-3' Ad2-5

$OD_{260} = 29.5$ (100 nmol, 10%), $\epsilon_{260} = 297300 \text{ L} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

HPLC: $t_R = 14.5 \text{ min}$ (0-50 ACN in 0.1 M TEAA in 15 min, 260 nm)

MALDI-TOF (m/z): ber.: 9949.2 $[M+H]^+$; gef.: 9941.4



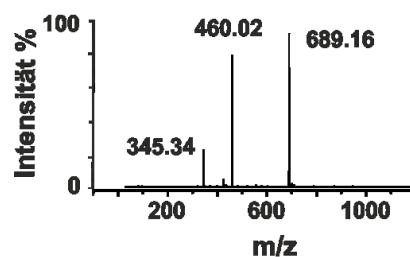
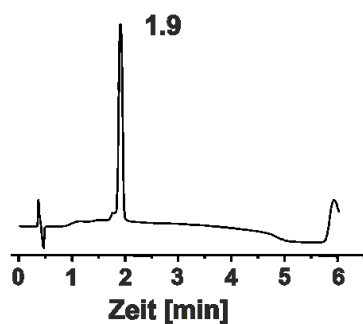
7.4.5 Charakterisierung von Peptoid-modifizierter DNA

Peptoid 1 P1

HPLC: $t_R = 1.9$ min (0-50 ACN in 4 min, 210 nm)

$C_{67}H_{113}N_{10}O_{12}$, Gesamtausbeute: 8.9 mg (gravimetrisch), 6.5 μ mol, 65%.

ESI (m/z): ber.: 689.94 $[M+2H]^{2+}$, 460.02 $[M+3H]^{3+}$, 347.97 $[M+4H]^{4+}$; gef.: 689.16, 460.02, 345.34

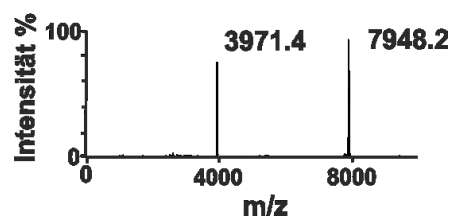
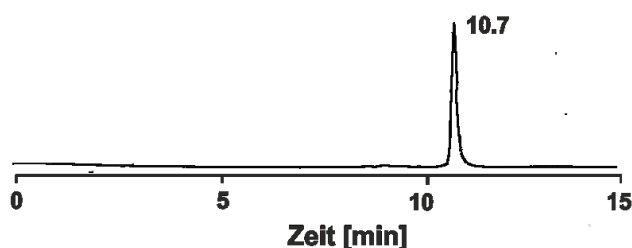


5'-P1-TCATTCCAGATCTCCTTACGC-3' P1-1-DNA

$OD_{280} = 14.2$ (75 nmol, 33%), $\epsilon_{280} = 187800 \text{ L} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

HPLC: $t_R = 10.7$ min (0-50 ACN in 0.1 M TEAA in 12 min, 260 nm)

MALDI-TOF (m/z): ber.: 7943.7 $[M+H]^+$, 3973.4 $[M+2H]^{2+}$; gef.: 7948.2, 3971.4

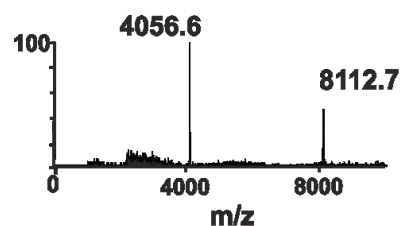
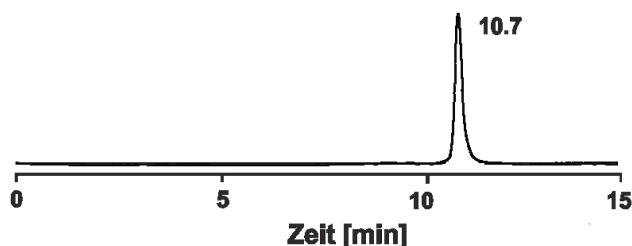


5'-P1-GTTTCAGTGACATAGGCCAGT-3' P1-2-DNA

$OD_{280} = 17.1$ (83 nmol, 31%), $\epsilon_{280} = 206200 \text{ L} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

HPLC: $t_R = 10.7$ min (0-50 ACN in 0.1 M TEAA in 12 min, 260 nm)

MALDI-TOF (m/z): ber.: 8112.3 $[M+H]^+$, 4057.7 $[M+2H]^{2+}$; gef.: 8112.7, 4056.6

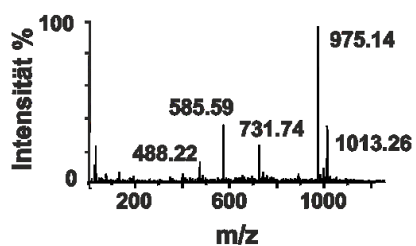
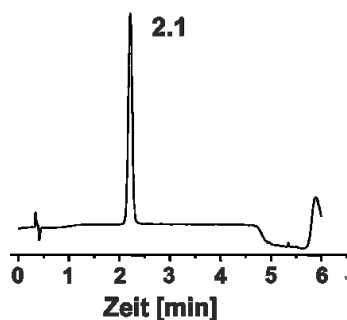


Peptoid 2 P2

HPLC: $t_R = 2.1$ min (0-50 ACN in 4 min, 210 nm)

$C_{145}H_{245}N_{37}O_{26}$, Gesamtausbeute: 7.0 mg (gravimetrisch), 2.4 μ mol, 24%.

ESI (m/z): ber.: 1012.63 $[M+K]^+$, 976.63 $[M+3H]^{3+}$, 734.22 $[M+4H]^{4+}$, 589.18 $[M+5H]^{5+}$, 492.82 $[M+6H]^{6+}$;
gef.: 1013.26, 975.14, 731.74, 585.59, 488.22.

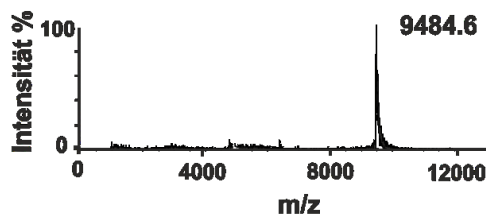
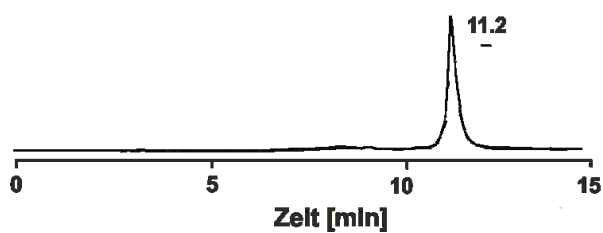


5'-P2-TCATTCCAGATCTCCTTACGC-3' P2-1-DNA

$OD_{260} = 21.7$ (105 nmol, 48%), $\epsilon_{260} = 187800 \text{ L} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

HPLC: $t_R = 11.2$ min (0-50 ACN in 0.1 M TEAA in 12 min, 260 nm)

MALDI-TOF (m/z): ber.: 9489.3 $[M+H]^+$; gef.: 9484.6.



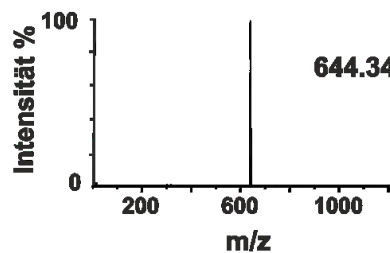
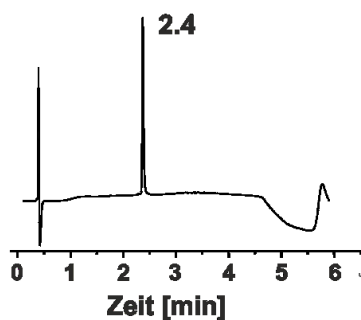
7.4.6 Charakterisierung von Cilengitid-modifizierter DNA

Cilengitid C

HPLC: $t_R = 2.4$ min (0-50 ACN in 4 min, 210 nm)

$C_{28}H_{41}N_{11}O_7$, Gesamtausbeute: 3.6 mg (gravimetrisch), 2.5 μ mol, 5%.

ESI (m/z): ber.: 644.32 $[M+H]^+$; gef.: 644.34.

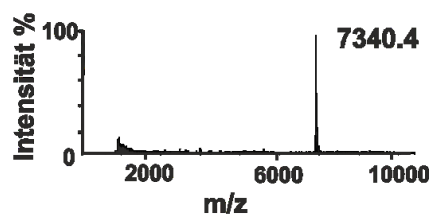
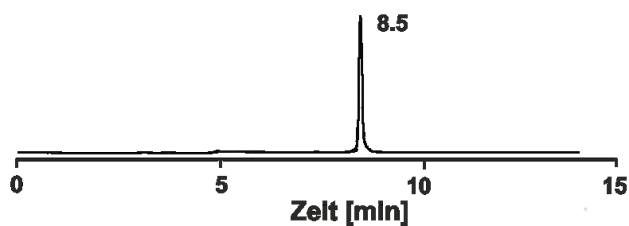


5'-CII-CGCTTATTATGGAGCTCGACA-3' CII-DNA

$OD_{260} = 23.1$ (101 nmol, 47%), $\epsilon_{260} = 228200 \text{ L} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

HPLC: $t_R = 8.5$ min (0-50 ACN in 0.1 M TEAA in 10 min, 260 nm)

MALDI-TOF (m/z): ber.: 7338.5 $[M+H]^+$; gef.: 7340.4.



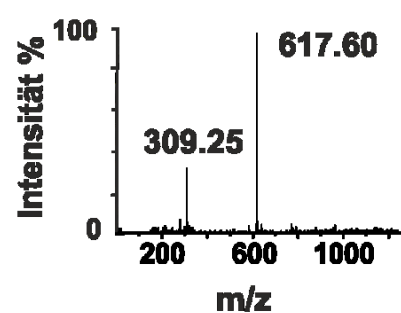
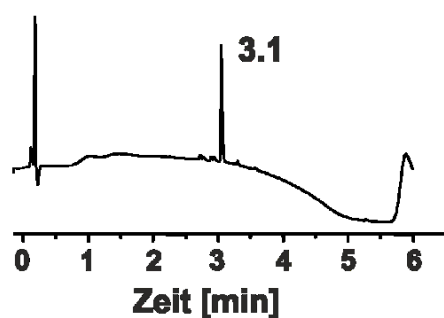
7.4.7 Charakterisierung von linker-modifiziertem Rhodamin B

Linker-modifiziertes Rhodamin B **23**

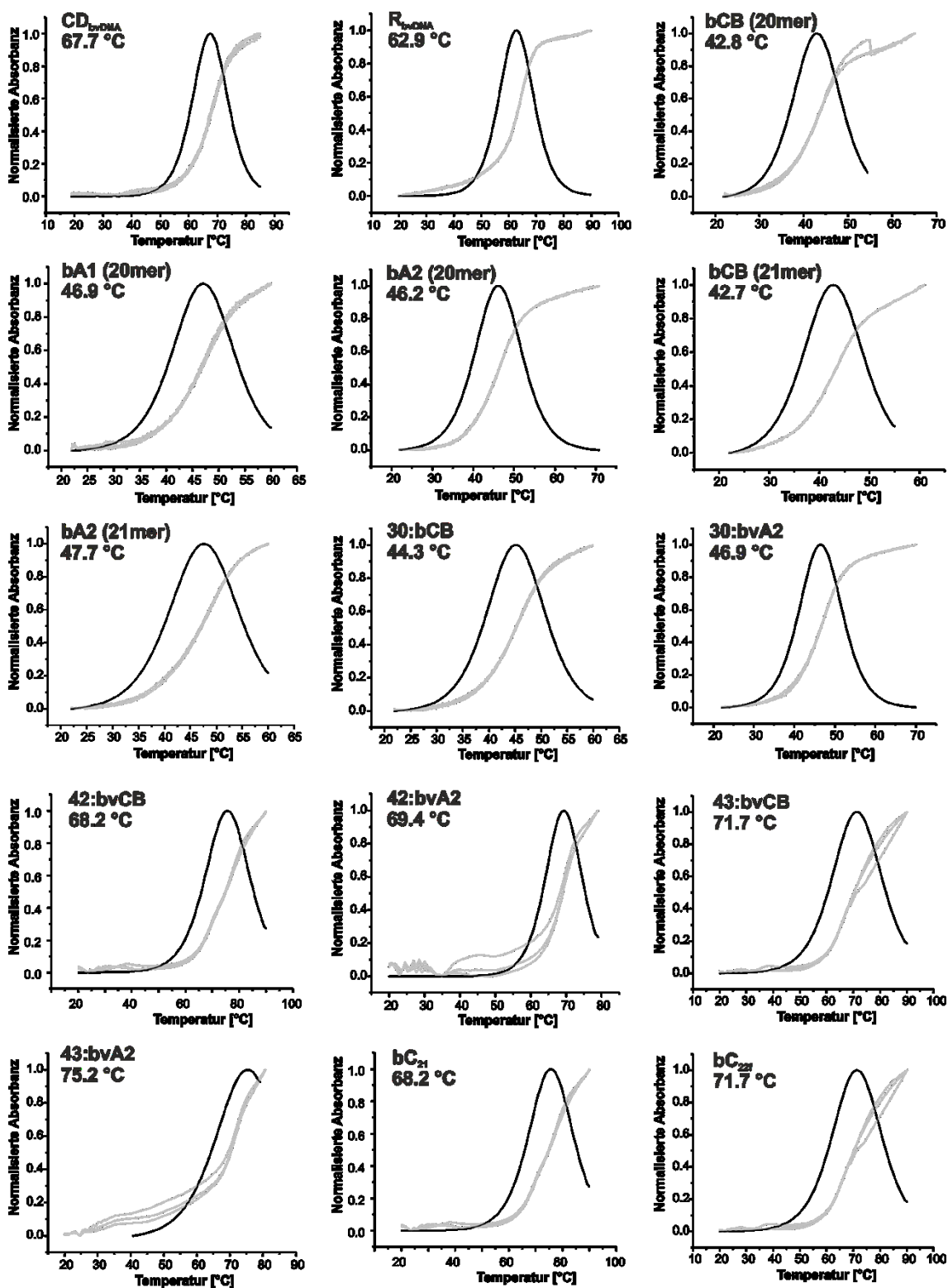
HPLC: $t_R = 3.1$ min (0-50 ACN in 4 min, 210 nm)

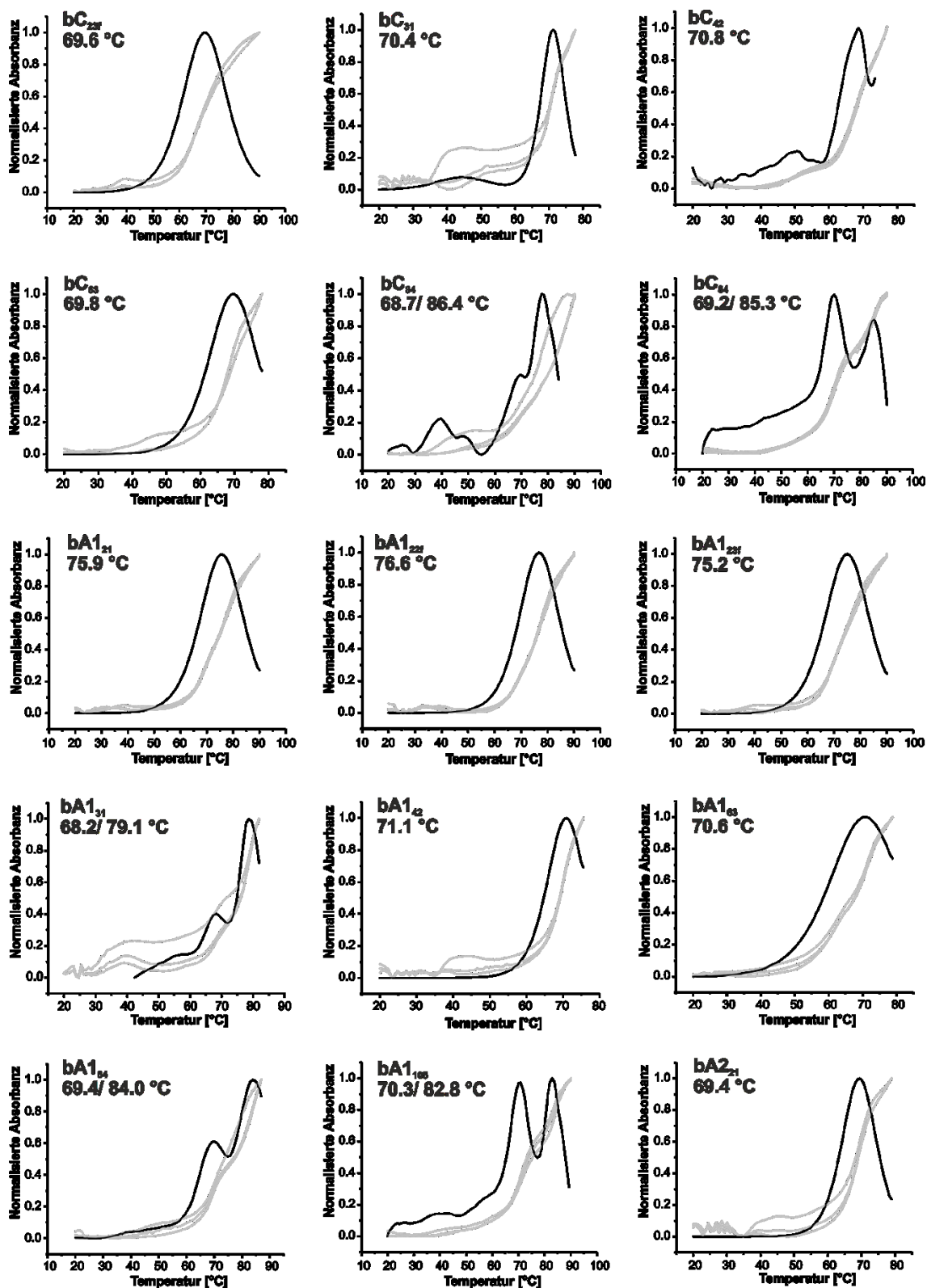
$C_{35}H_{45}N_4O_4S^+$

ESI (m/z): ber.: 617.32 $[M+H]^+$, 309.66 $[M+2H]^{2+}$; gef.: 617.60, 309.25.

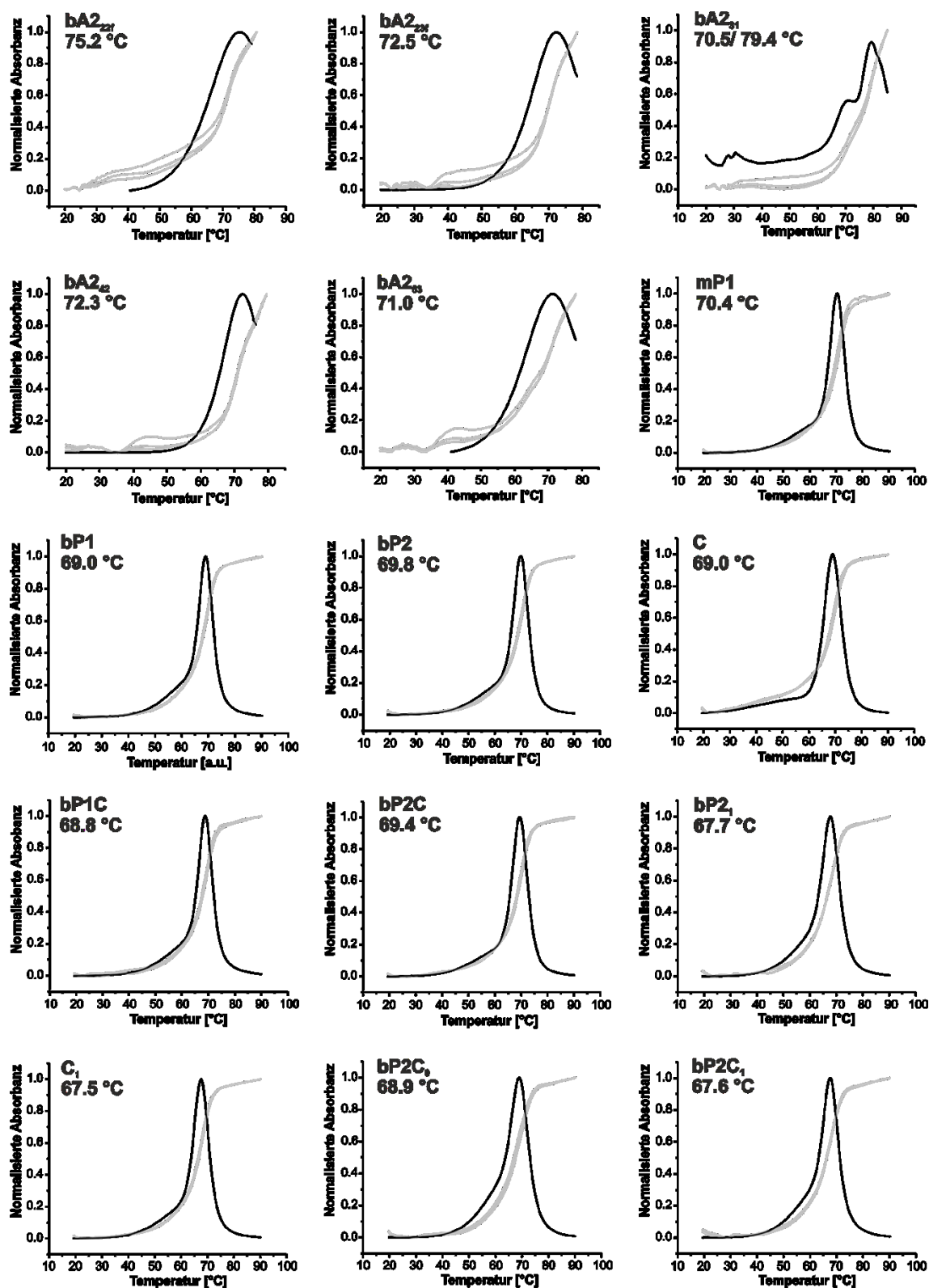


7.4.8 Schmelzkurven

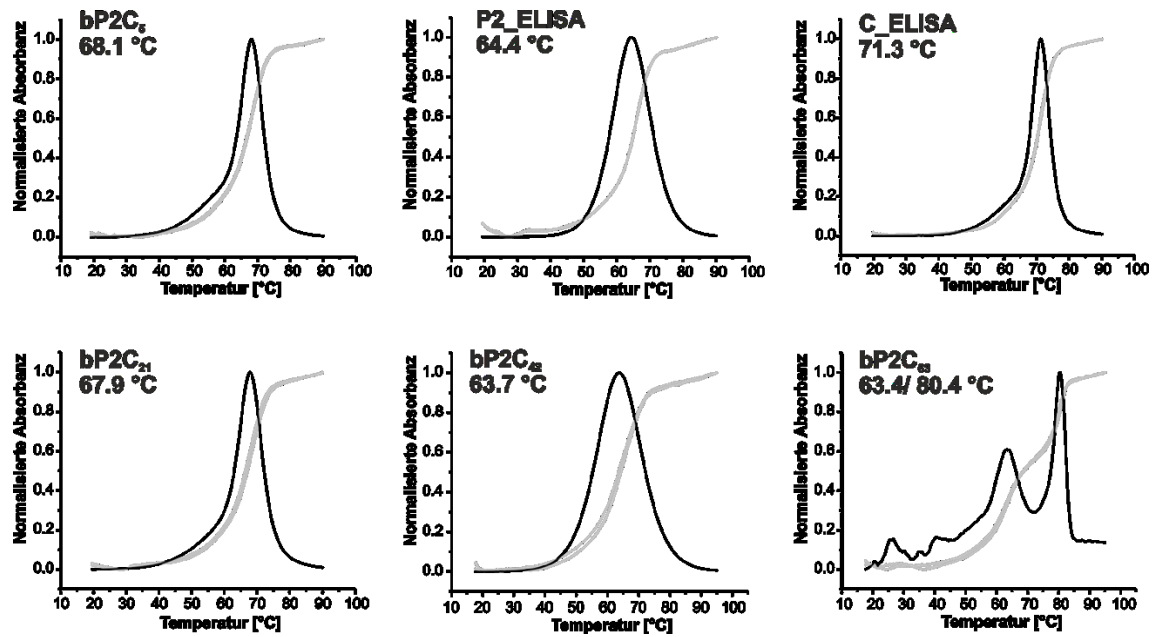




7.4 Charakterisierung von DNA, Peptiden und Peptidmimetika

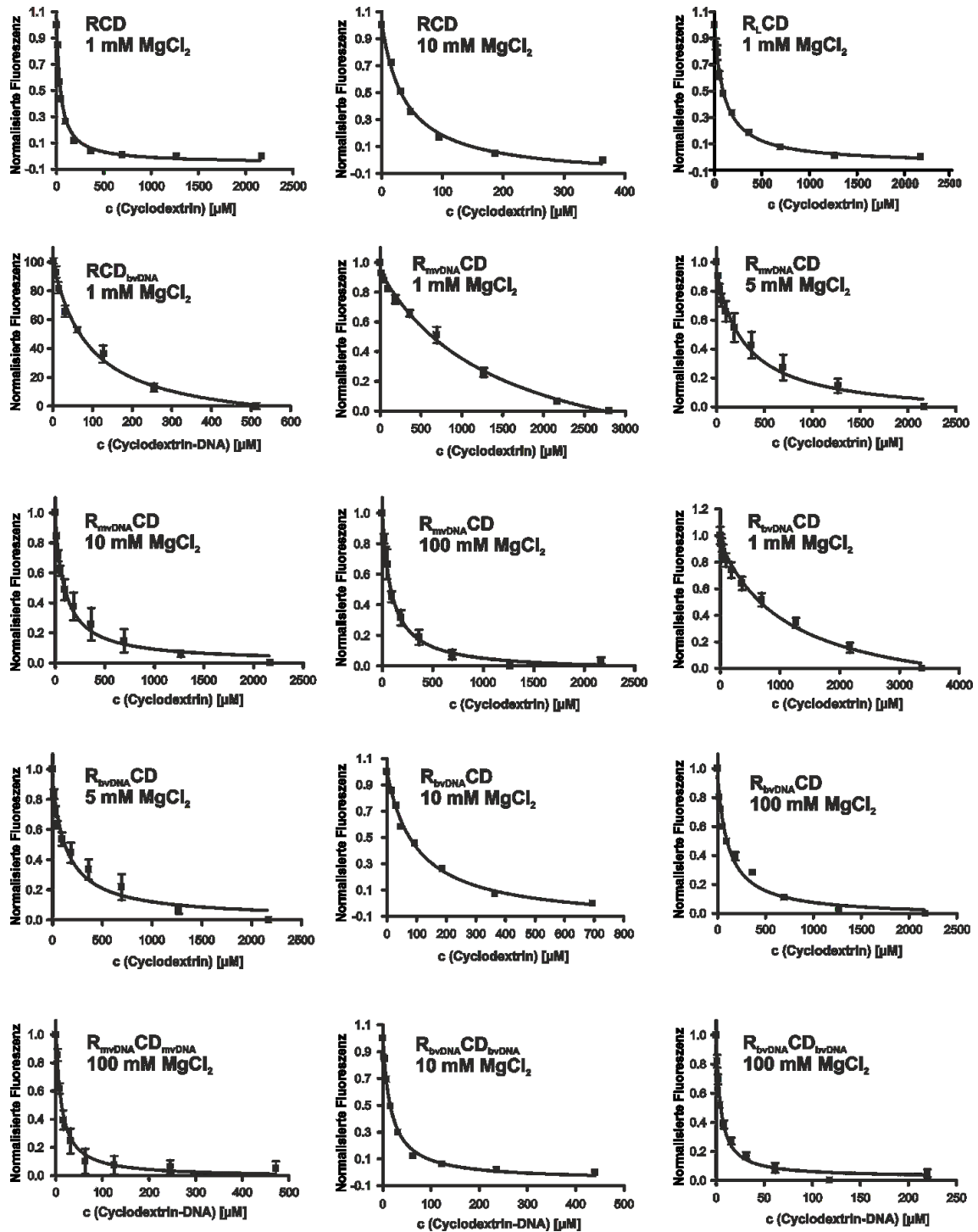


7.4 Charakterisierung von DNA, Peptiden und Peptidmimetika

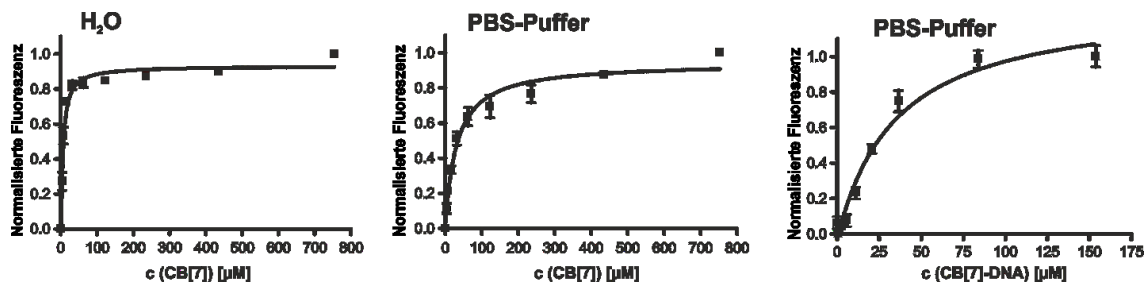


7.5 Bindungskurven

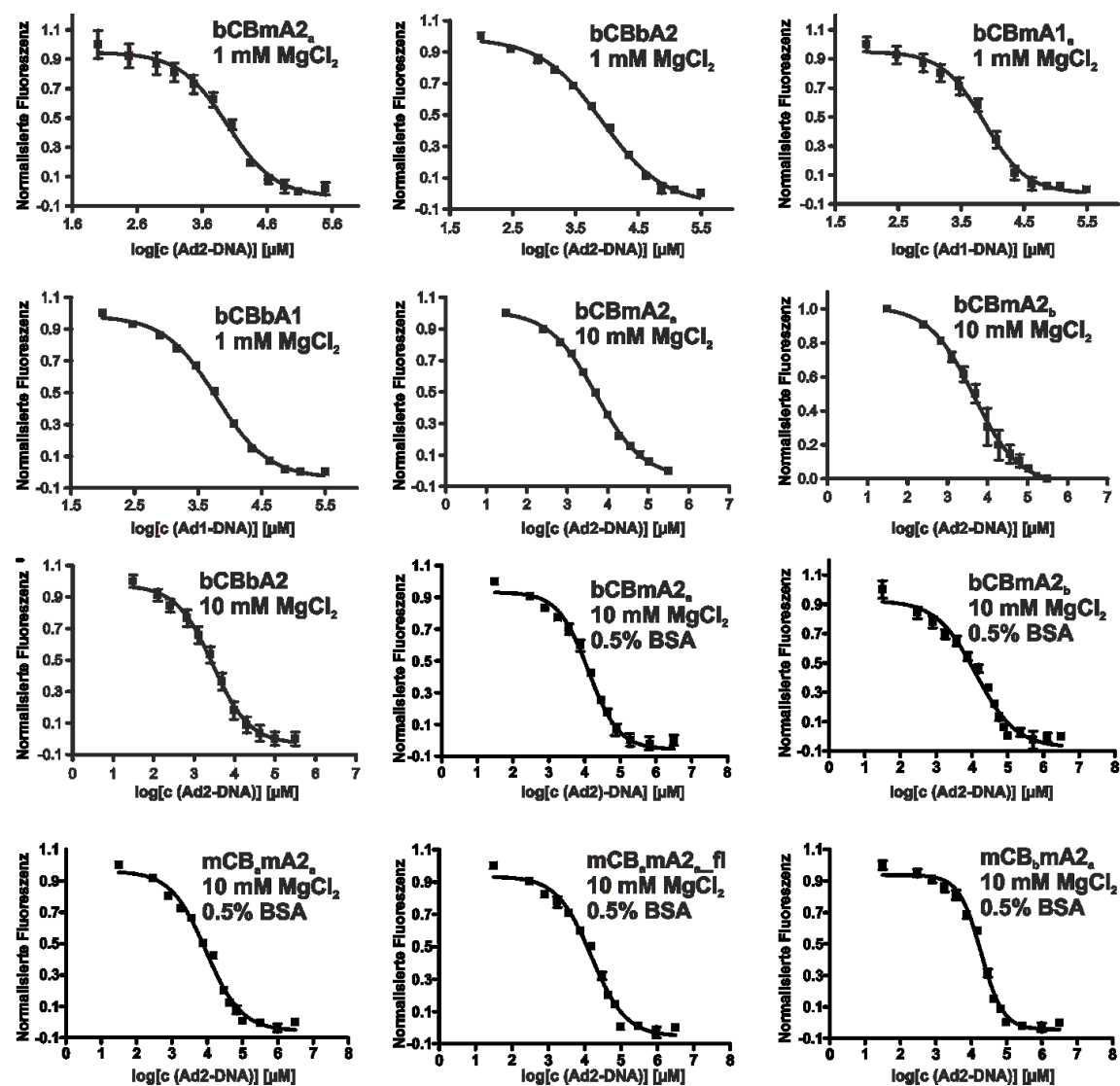
7.5.1 Bindungskurven von β -Cyclodextrin und Rhodamin B



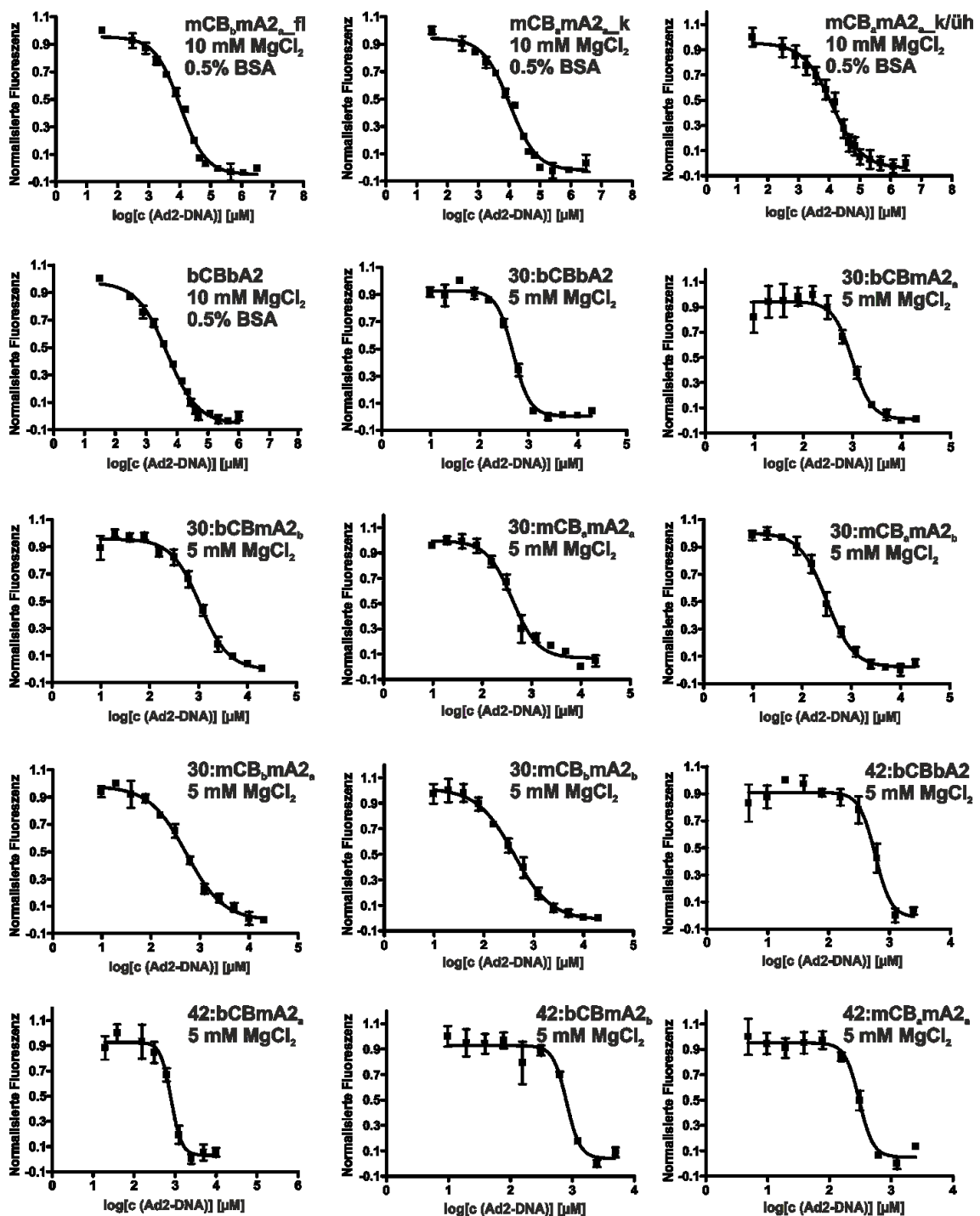
7.5.2 CB[7]/Rhodamin B Bindungskurven



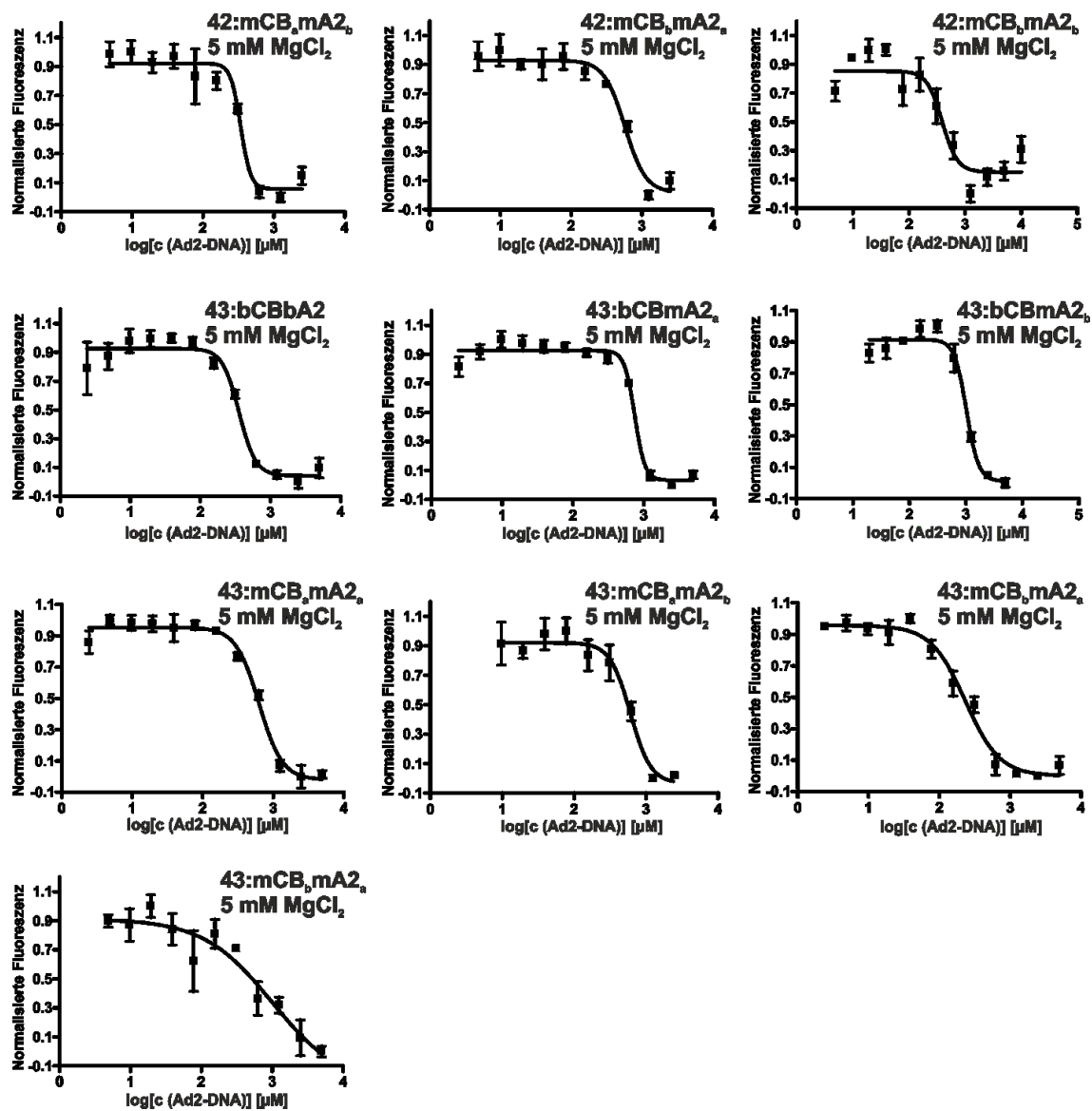
7.5.3 Fluoreszenzänderung bei Konkurrenz von Rhodamin B aus CB[7]-DNA mit Adamantyl-DNA



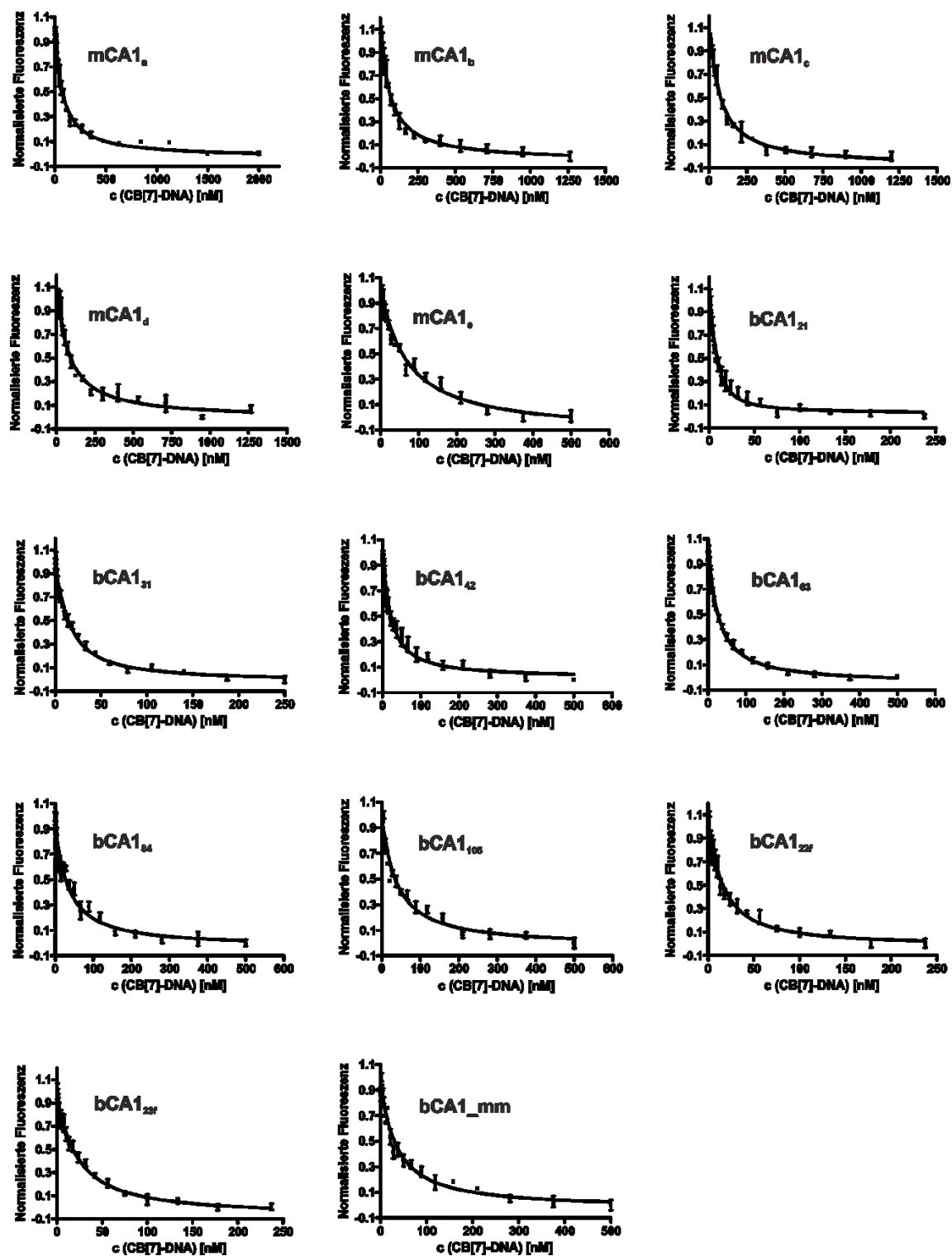
7.5.4 Fluoreszenzänderung bei Konkurrenz von Pyronin B aus CB[7]-DNA mit Adamantyl-DNA



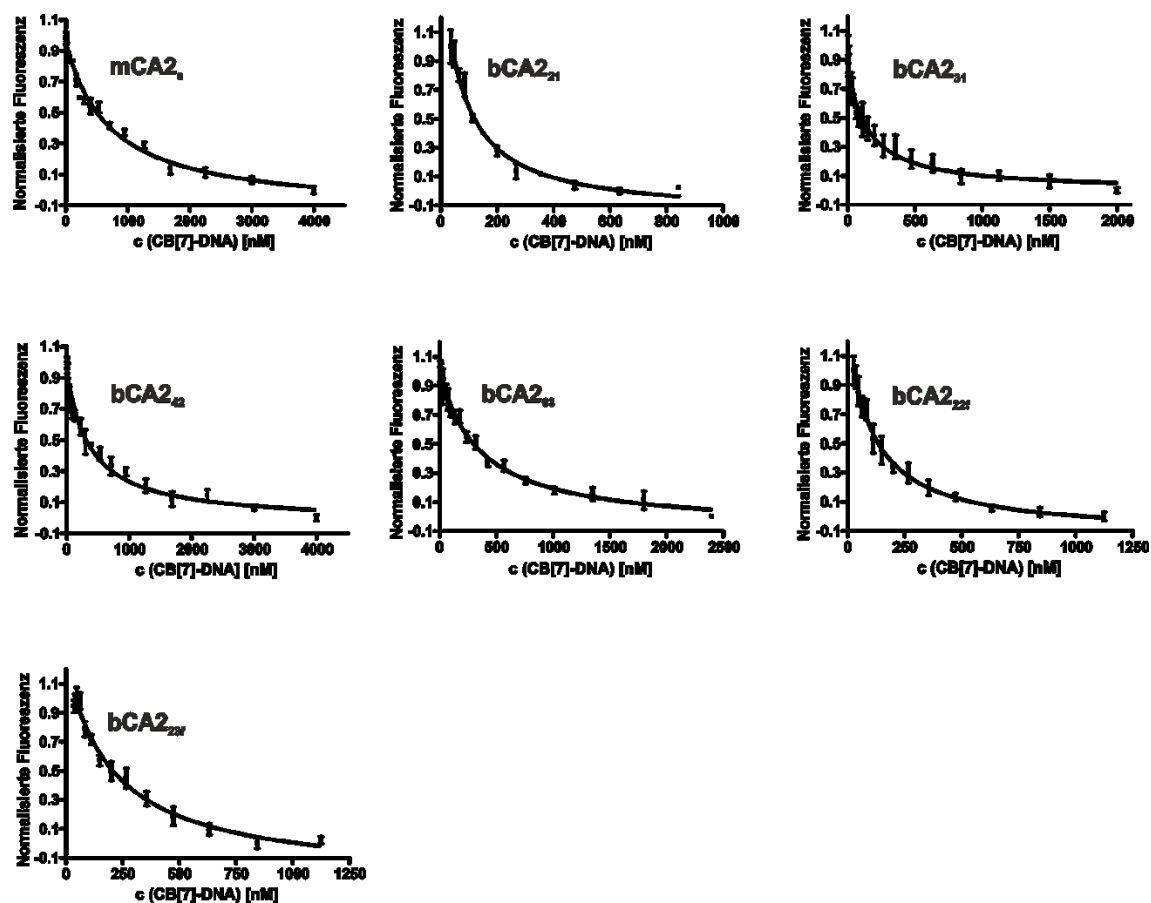
7.5 Bindungskurven



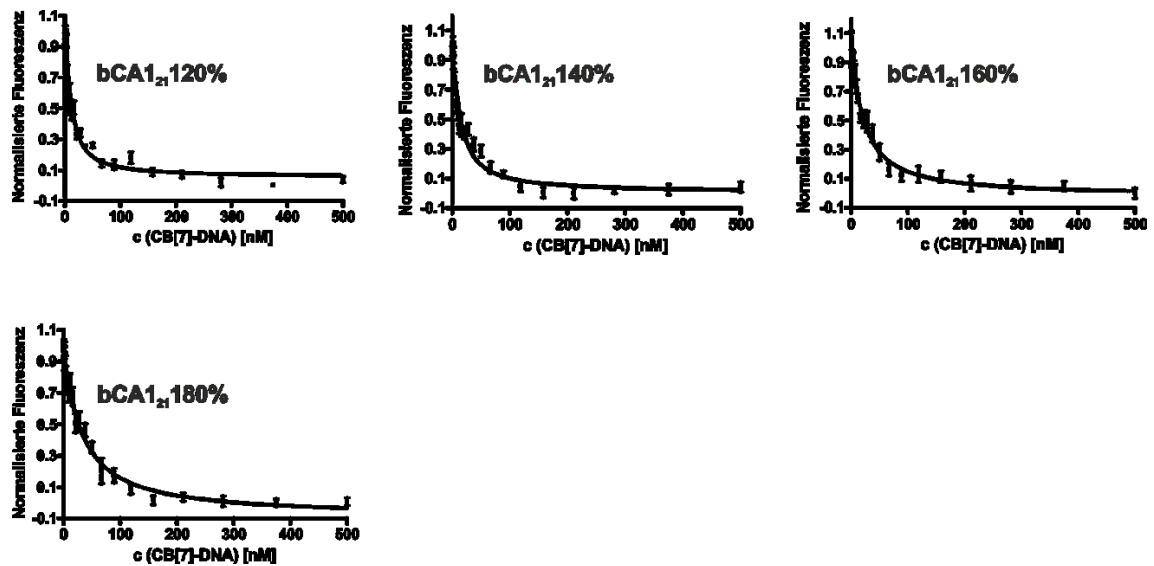
7.5.5 Bindungskurven von CB[7]-DNA und Ad1-DNA



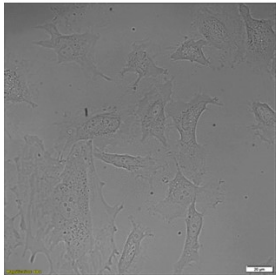
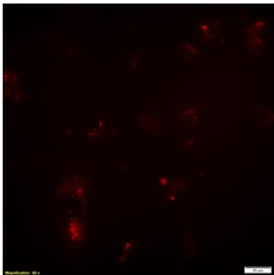
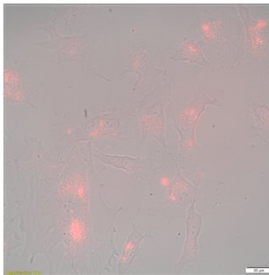
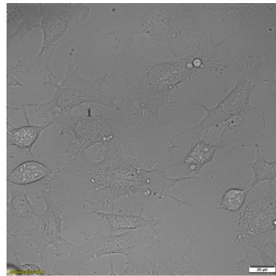
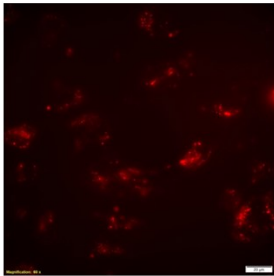
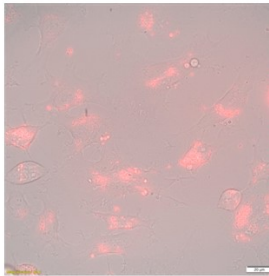
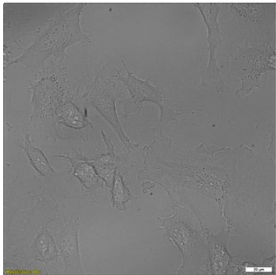
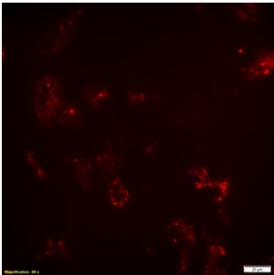
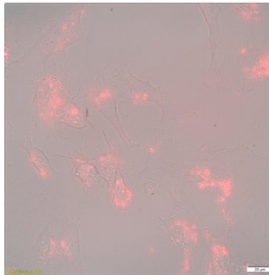
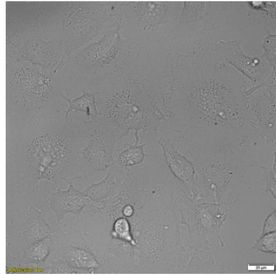
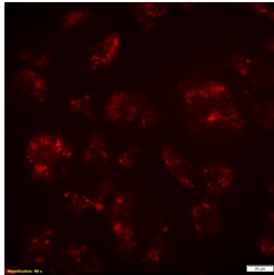
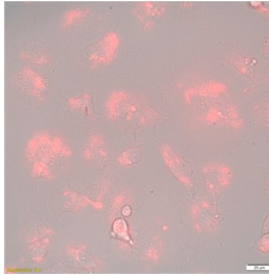
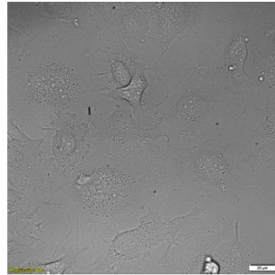
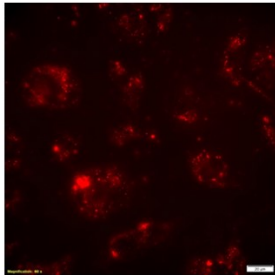
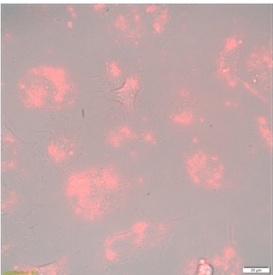
7.5.6 Bindungskurven von CB[7]-DNA und Ad2-DNA



7.5.7 Bindungskurven von CB[7]-DNA und Ad1-DNA bei verschiedenen Temperaturkonzentrationen



7.6 Mikroskopiebilder

Komplex und Bedingungen	Hellfeld-Kanal	TRITC-Kanal	Hellfeld- und Tritc-Kanal
mP1 c = 250 nM ohne Blocklösung Graustufenbereich: 2200-18000 HUVEC			
bP1 c = 250 nM ohne Blocklösung Graustufenbereich: 2200-18000 HUVEC			
bP2 c = 250 nM ohne Blocklösung Graustufenbereich: 2200-18000 HUVEC			
bP1C c = 250 nM ohne Blocklösung Graustufenbereich: 2200-18000 HUVEC			
bP2C c = 250 nM ohne Blocklösung Graustufenbereich: 2200-18000 HUVEC			

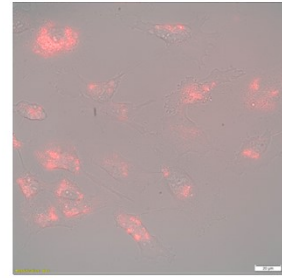
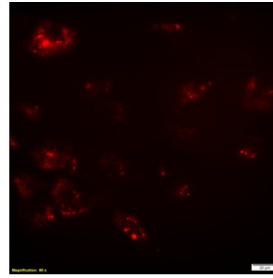
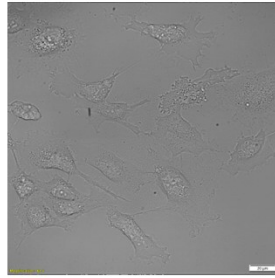
**Komplex und
Bedingungen**

Hellfeld-Kanal

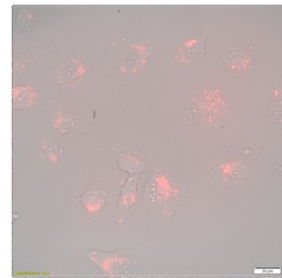
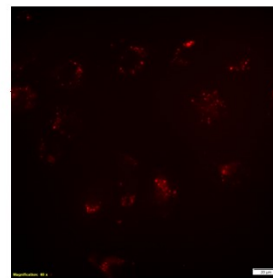
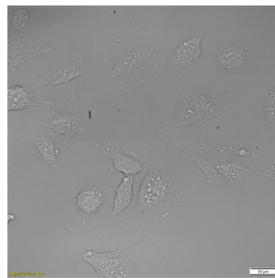
TRITC-Kanal

**Hellfeld- und Tritc-
Kanal**

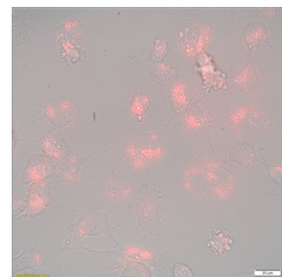
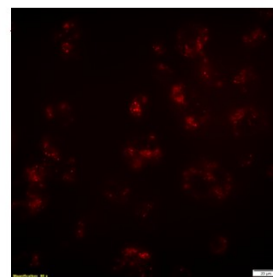
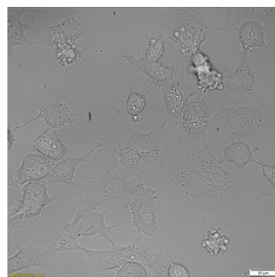
C
c = 250 nM
ohne Blocklösung
Graustufenbereich:
2200-18000
HUVEC



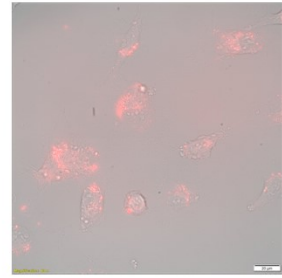
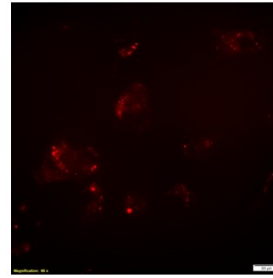
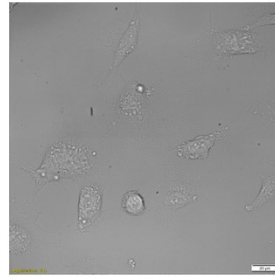
mP1
c = 100 nM
ohne Blocklösung
Graustufenbereich:
2200-18000
HUVEC



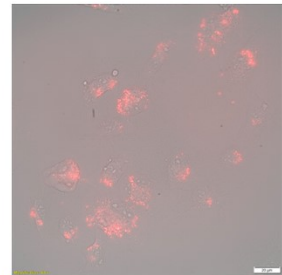
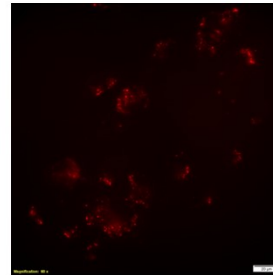
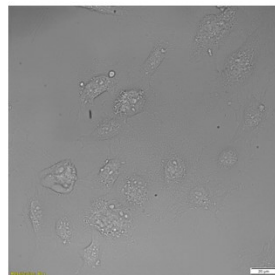
bP1
c = 100 nM
ohne Blocklösung
Graustufenbereich:
2200-18000
HUVEC

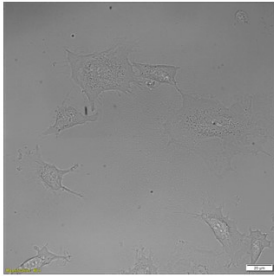
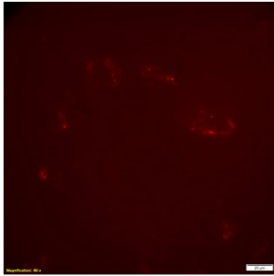
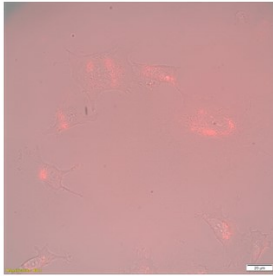
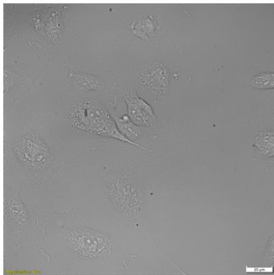
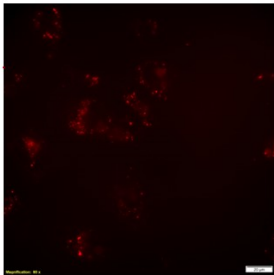
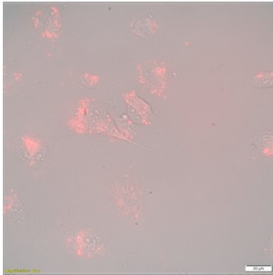
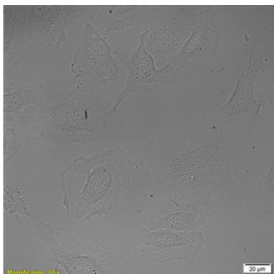
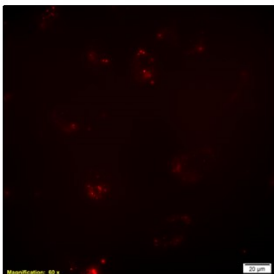
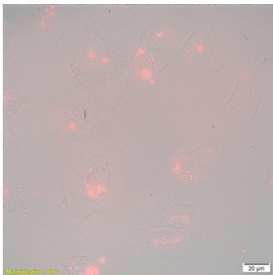
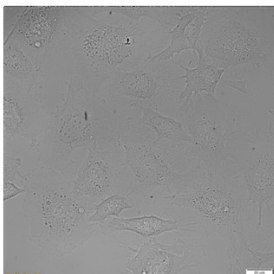
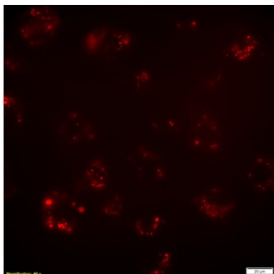
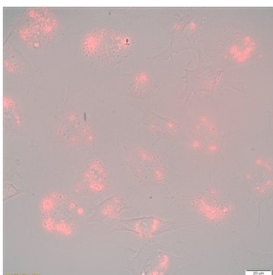
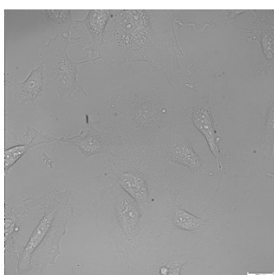
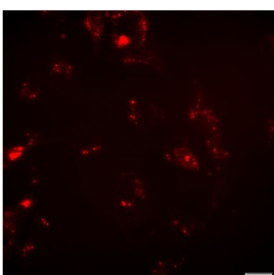
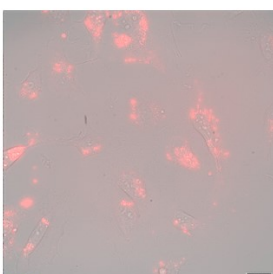


bP2
c = 100 nM
ohne Blocklösung
Graustufenbereich:
2200-18000
HUVEC



bP1C
c = 100 nM
ohne Blocklösung
Graustufenbereich:
2200-18000
HUVEC



Komplex und Bedingungen	Hellfeld-Kanal	TRITC-Kanal	Hellfeld- und Tritc-Kanal
bP2C c = 100 nM ohne Blocklösung Graustufenbereich: 2200-18000 HUVEC			
C c = 100 nM ohne Blocklösung Graustufenbereich: 2200-18000 HUVEC			
mP1 c = 250 nM mit Blocklösung Graustufenbereich: 2200-15000 HUVEC			
bP1 c = 250 nM mit Blocklösung Graustufenbereich: 2200-15000 HUVEC			
bP2 c = 250 nM mit Blocklösung Graustufenbereich: 2200-15000 HUVEC			

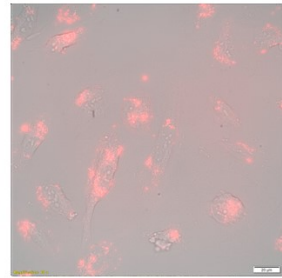
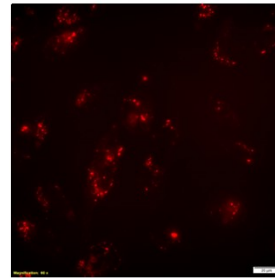
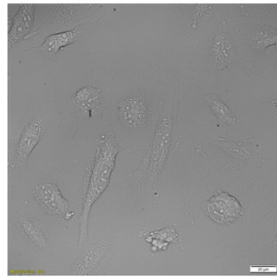
**Komplex und
Bedingungen**

Hellfeld-Kanal

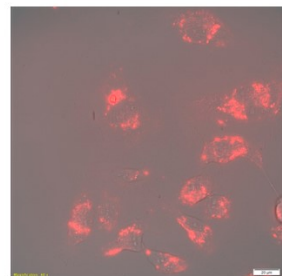
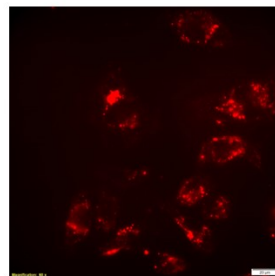
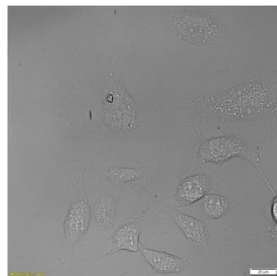
TRITC-Kanal

**Hellfeld- und Tritc-
Kanal**

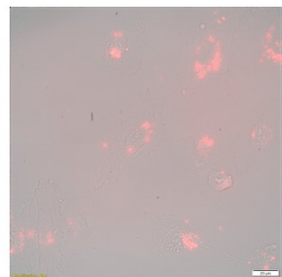
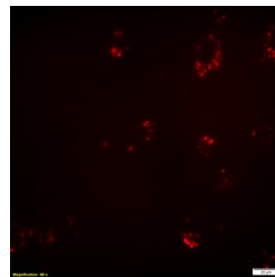
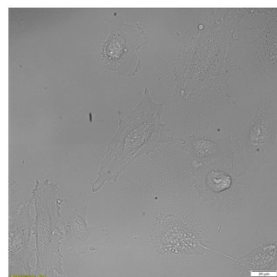
bP1C
c = 250 nM
mit Blocklösung
Graustufenbereich:
2200-15000
HUVEC



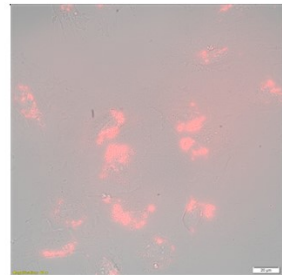
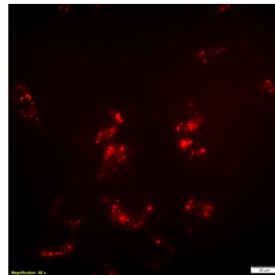
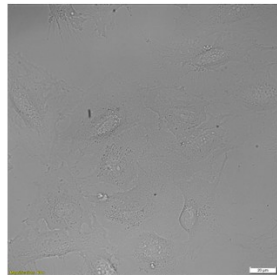
bP2C
c = 250 nM
mit Blocklösung
Graustufenbereich:
2200-15000
HUVEC



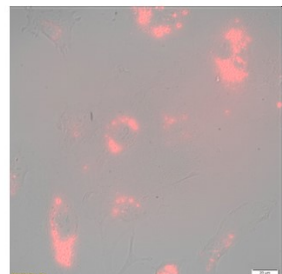
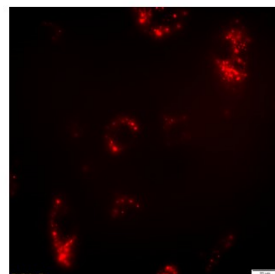
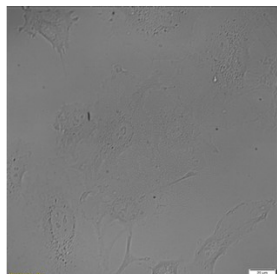
C
c = 250 nM
mit Blocklösung
Graustufenbereich:
2200-15000
HUVEC



mP1
c = 100 nM
mit Blocklösung
Graustufenbereich:
2200-15000
HUVEC



bP1
c = 100 nM
mit Blocklösung
Graustufenbereich:
2200-15000
HUVEC



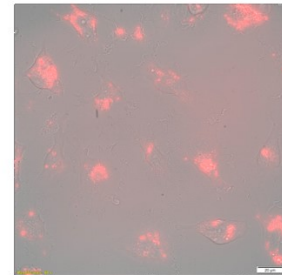
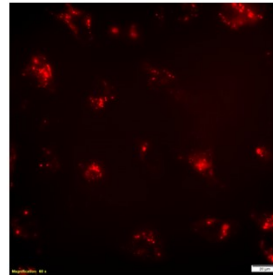
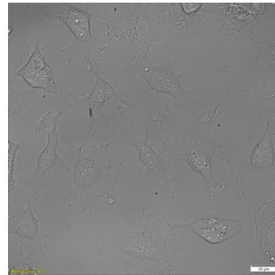
**Komplex und
Bedingungen**

Hellfeld-Kanal

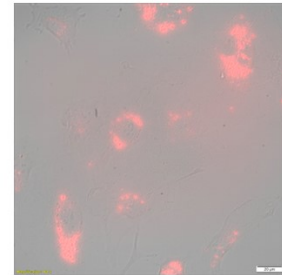
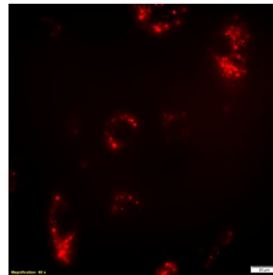
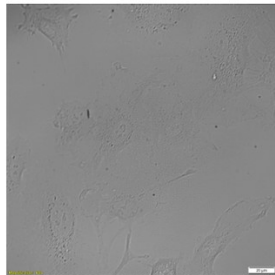
TRITC-Kanal

**Hellfeld- und Tritc-
Kanal**

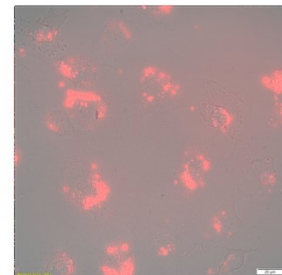
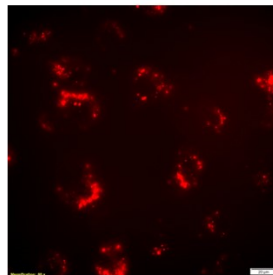
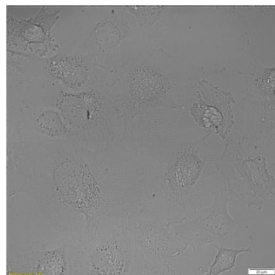
bP2
c = 100 nM
mit Blocklösung
Graustufenbereich:
2200-15000
HUVEC



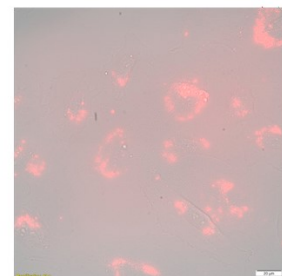
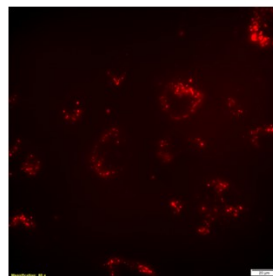
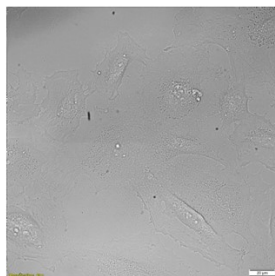
bP1C
c = 100 nM
mit Blocklösung
Graustufenbereich:
2200-15000
HUVEC



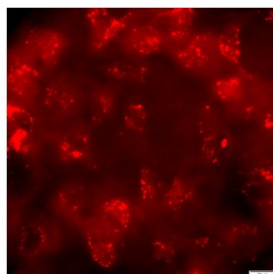
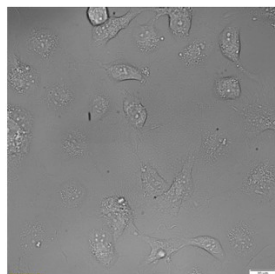
bP2C
c = 100 nM
mit Blocklösung
Graustufenbereich:
2200-15000
HUVEC



C
c = 100 nM
mit Blocklösung
Graustufenbereich:
2200-15000
HUVEC



bP2C₀
c = 250 nM
mit Blocklösung
Graustufenbereich:
5000-15000
HUVEC



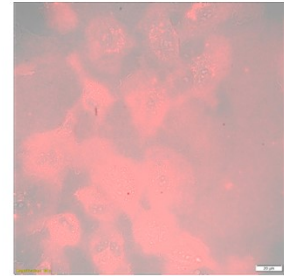
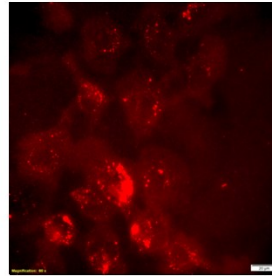
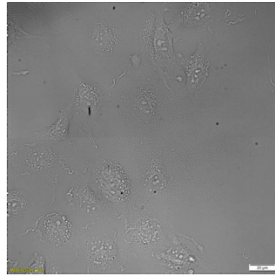
**Komplex und
Bedingungen**

Hellfeld-Kanal

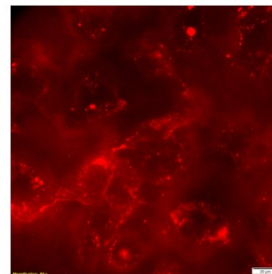
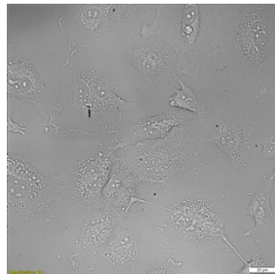
TRITC-Kanal

**Hellfeld- und Tritc-
Kanal**

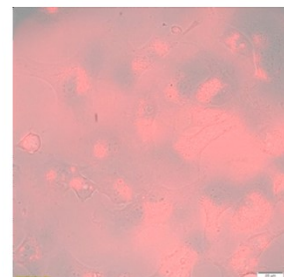
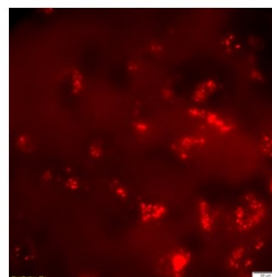
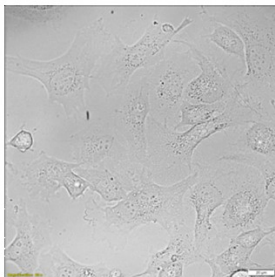
bP2C₁
c = 250 nM
mit Blocklösung
Graustufenbereich:
5000-15000
HUVEC



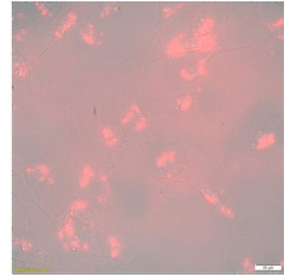
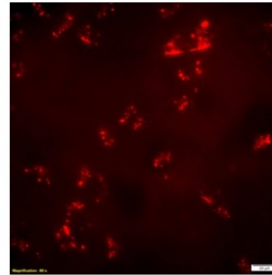
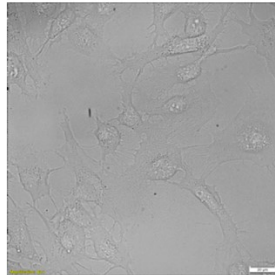
bP2C₁
c = 250 nM
mit Blocklösung
Graustufenbereich:
5000-15000
HUVEC



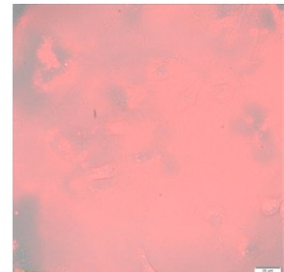
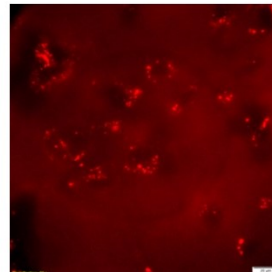
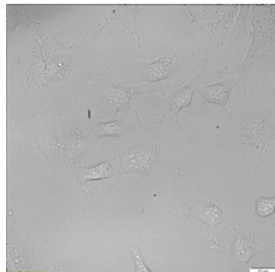
bP2C₀
c = 20 nM
mit Blocklösung
Graustufenbereich:
2000-7000
HUVEC



bP2C₁
c = 200 nM
mit Blocklösung
Graustufenbereich:
2000-7000
HUVEC



bP2C₀
c = 20 nM
mit Blocklösung
Graustufenbereich:
2000-7000
HUVEC



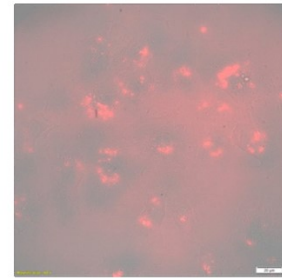
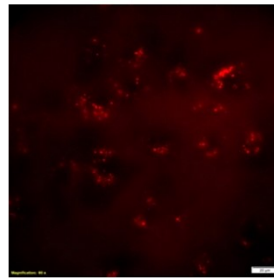
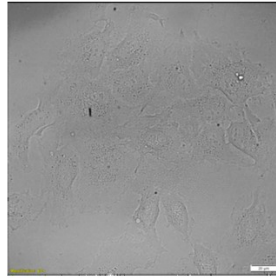
**Komplex und
Bedingungen**

Hellfeld-Kanal

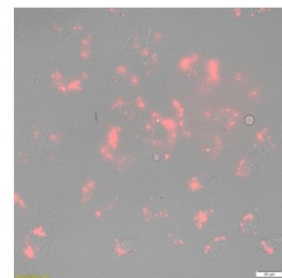
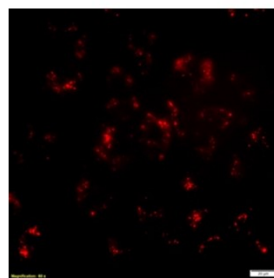
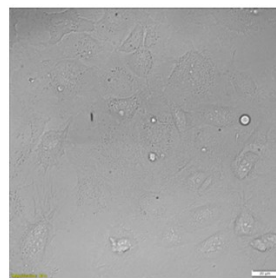
TRITC-Kanal

**Hellfeld- und Tritc-
Kanal**

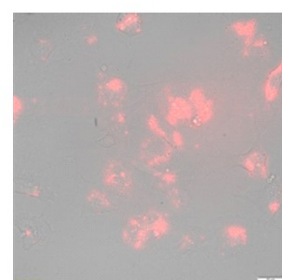
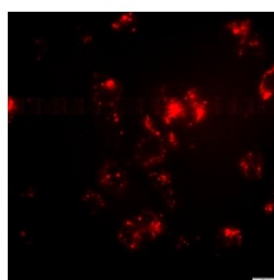
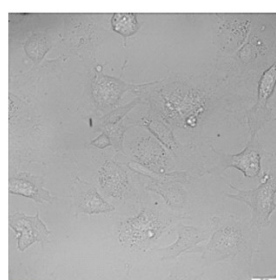
bP2₁
c = 20 nM
mit Blocklösung
Graustufenbereich:
2000-7000
HUVEC



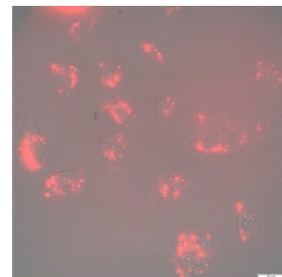
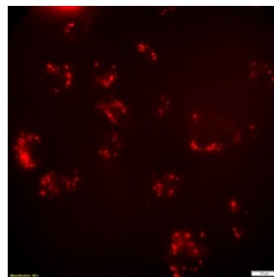
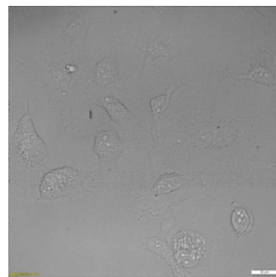
C₁
c = 20nM
mit Blocklösung
Graustufenbereich:
2000-7000
HUVEC



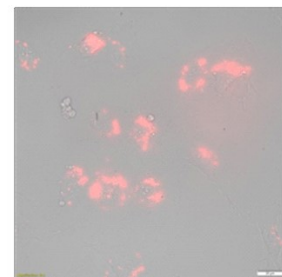
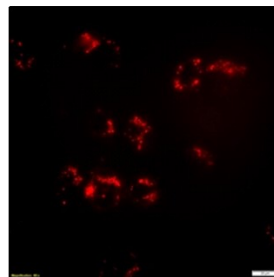
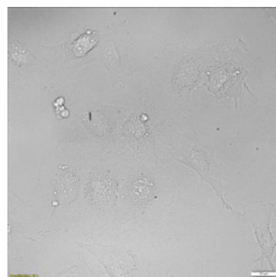
bP2C₀
c = 2 nM
mit Blocklösung
Graustufenbereich:
2000-7000
HUVEC



bP2C₁
c = 2 nM
mit Blocklösung
Graustufenbereich:
2000-7000
HUVEC



bP2C₅
c = 2 nM
mit Blocklösung
Graustufenbereich:
2000-7000
HUVEC



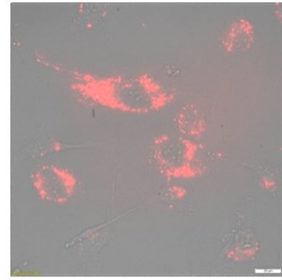
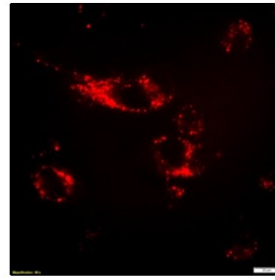
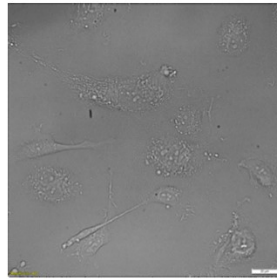
**Komplex und
Bedingungen**

Hellfeld-Kanal

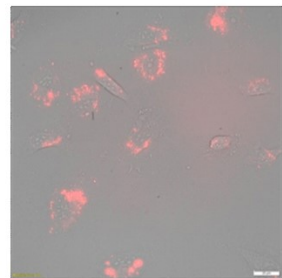
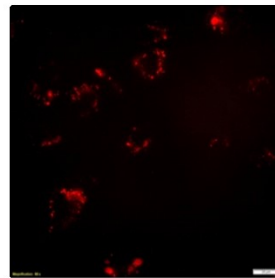
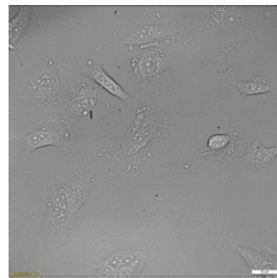
TRITC-Kanal

**Hellfeld- und Tritc-
Kanal**

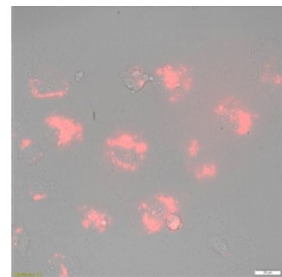
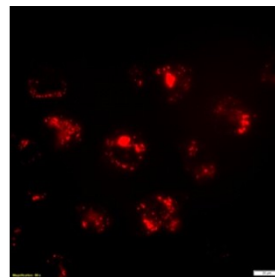
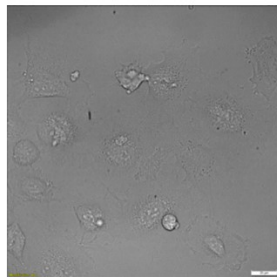
bP2C₀
c = 5 nM
mit Blocklösung
Graustufenbereich:
2000-8000
HUVEC



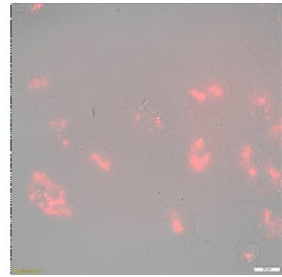
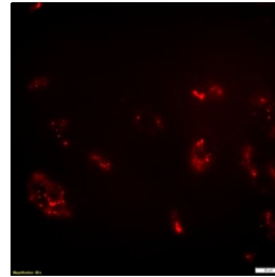
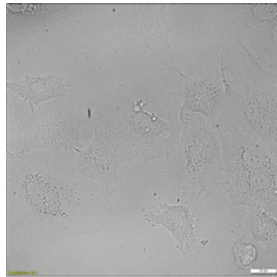
bP2C₁
c = 5 nM
mit Blocklösung
Graustufenbereich:
2000-8000
HUVEC



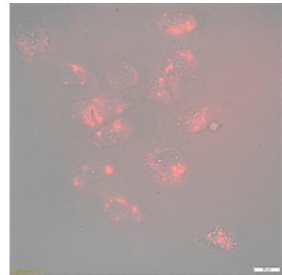
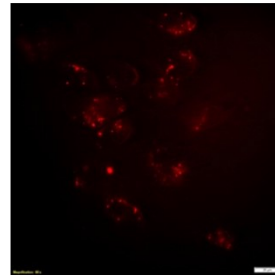
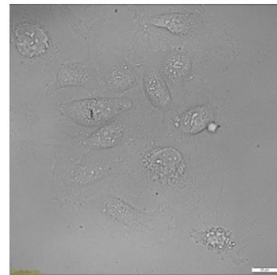
bP2C₀
c = 5 nM
mit Blocklösung
Graustufenbereich:
2000-8000
HUVEC



bP2₁
c = 5 nM
mit Blocklösung
Graustufenbereich:
2000-8000
HUVEC



C₁
c = 5 nM
mit Blocklösung
Graustufenbereich:
2000-8000
HUVEC



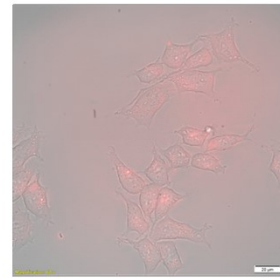
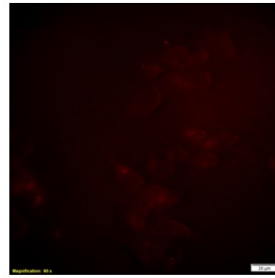
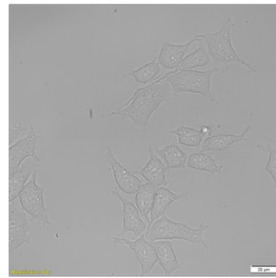
**Komplex und
Bedingungen**

Hellfeld-Kanal

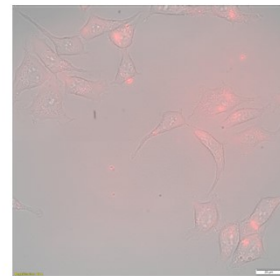
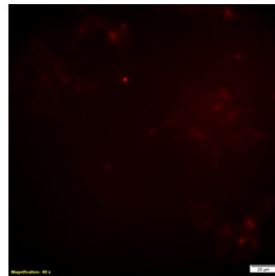
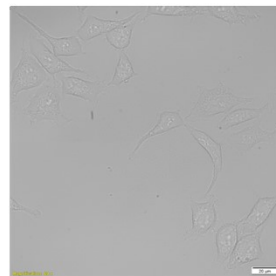
TRITC-Kanal

**Hellfeld- und Tritc-
Kanal**

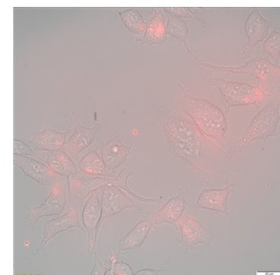
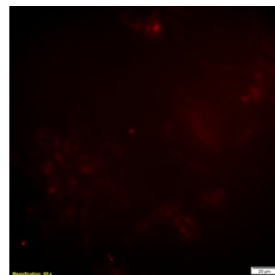
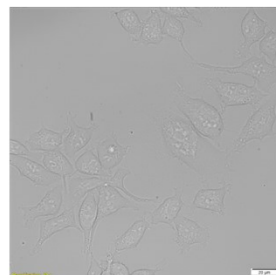
bP2C₁
c = 5 nM
mit Blocklösung
Graustufenbereich:
2000-8000
HEK293



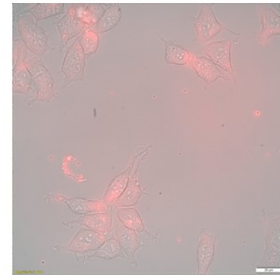
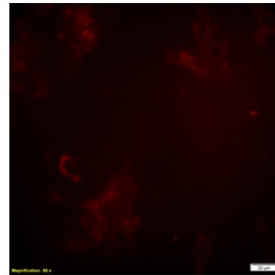
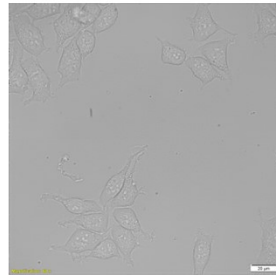
bP2C₁
c = 5 nM
mit Blocklösung
Graustufenbereich:
2000-8000
HEK293



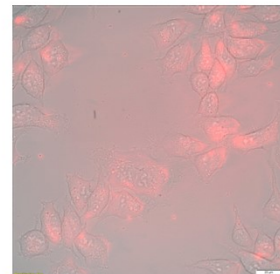
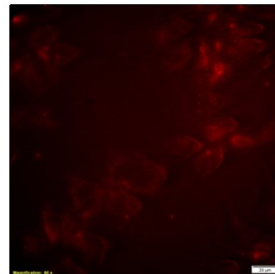
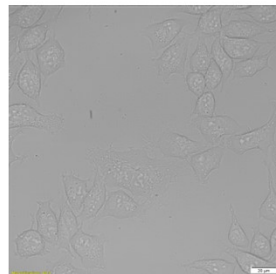
bP2C₁
c = 5 nM
mit Blocklösung
Graustufenbereich:
2000-8000
HEK293



bP2₁
c = 5 nM
mit Blocklösung
Graustufenbereich:
2000-8000
HEK293



C₁
c = 5 nM
mit Blocklösung
Graustufenbereich:
2000-8000
HEK293



8 Literaturverzeichnis

1. Seeman, N. C., An overview of structural DNA nanotechnology. *Molecular biotechnology* **2007**, *37* (3), 246-57.
2. Lin, C.; Liu, Y.; Yan, H., Designer DNA Nanoarchitectures. *Biochemistry* **2009**, *48* (8), 1663-1674.
3. Ke, Y.; Sharma, J.; Liu, M.; Jahn, K.; Liu, Y.; Yan, H., Scaffolded DNA Origami of a DNA Tetrahedron Molecular Container. *Nano Letters* **2009**, *9* (6), 2445-2447.
4. Andersen, E. S.; Dong, M.; Nielsen, M. M.; Jahn, K.; Subramani, R.; Mamdouh, W.; Golas, M. M.; Sander, B.; Stark, H.; Oliveira, C. L. P.; Pedersen, J. S.; Birkedal, V.; Besenbacher, F.; Gothelf, K. V.; Kjems, J., Self-assembly of a nanoscale DNA box with a controllable lid. *Nature* **2009**, *459*, 73.
5. Janssen, B. M.; van Rosmalen, M.; van Beek, L.; Merkx, M., Antibody activation using DNA-based logic gates. *Angewandte Chemie (International ed. in English)* **2015**, *54* (8), 2530-3.
6. Diezmann, F.; von Kleist, L.; Haucke, V.; Seitz, O., Probing heterobivalent binding to the endocytic AP-2 adaptor complex by DNA-based spatial screening. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2015**, *13* (29), 8008-8015.
7. Williams, B. A. R.; Diehnelt, C. W.; Belcher, P.; Greving, M.; Woodbury, N. W.; Johnston, S. A.; Chaput, J. C., Creating Protein Affinity Reagents by Combining Peptide Ligands on Synthetic DNA Scaffolds. *Journal of the American Chemical Society* **2009**, *131* (47), 17233-17241.
8. Eberhard, H.; Diezmann, F.; Seitz, O., DNA as a Molecular Ruler: Interrogation of a Tandem SH2 Domain with Self-Assembled, Bivalent DNA–Peptide Complexes. *Angewandte Chemie International Edition* **2011**, *50* (18), 4146-4150.
9. Somanath, P. R.; Malinin, N. L.; Byzova, T. V., Cooperation between integrin $\alpha v \beta 3$ and VEGFR2 in angiogenesis. *Angiogenesis* **2009**, *12* (2), 177-85.
10. Mammen, M.; Choi, S.-K.; Whitesides, G. M., Polyvalent Interactions in Biological Systems: Implications for Design and Use of Multivalent Ligands and Inhibitors. *Angewandte Chemie International Edition* **1998**, *37* (20), 2754-2794.
11. Tsyba, L.; Nikolaienko, O.; Dergai, O.; Dergai, M.; Novokhatska, O.; Skrypka, I.; Rynditch, A., Intersectin multidomain adaptor proteins: Regulation of functional diversity. *Gene* **2011**, *473* (2), 67-75.
12. Traub, L. M., Tickets to ride: selecting cargo for clathrin-regulated internalization. *Nature reviews. Molecular cell biology* **2009**, *10* (9), 583-96.
13. Smith, S. M.; Baker, M.; Halebian, M.; Smith, C. J., Weak Molecular Interactions in Clathrin-Mediated Endocytosis. *Frontiers in molecular biosciences* **2017**, *4*, 72.
14. Brett, T. J.; Traub, L. M.; Fremont, D. H., Accessory protein recruitment motifs in clathrin-mediated endocytosis. *Structure (London, England : 1993)* **2002**, *10* (6), 797-809.
15. Buday, L.; Wunderlich, L.; Tamas, P., The Nck family of adapter proteins: regulators of actin cytoskeleton. *Cellular signalling* **2002**, *14* (9), 723-31.
16. Bladt, F.; Aippersbach, E.; Gelkop, S.; Strasser, G. A.; Nash, P.; Tafuri, A.; Gertler, F. B.; Pawson, T., The Murine Nck SH2/SH3 Adaptors Are Important for the Development of Mesoderm-Derived Embryonic Structures and for Regulating the Cellular Actin Network. *Molecular and Cellular Biology* **2003**, *23* (13), 4586-4597.
17. Liu, R.; Jiang, B.; Yu, H.; Chaput, J. C., Generating DNA Synbodies from Previously Discovered Peptides. *ChemBioChem* **2011**, *12* (12), 1813-1817.
18. Engelen, W.; Janssen, B. M. G.; Merkx, M., DNA-based control of protein activity. *Chemical Communications* **2016**, *52* (18), 3598-3610.
19. Angelin, A.; Weigel, S.; Garrecht, R.; Meyer, R.; Bauer, J.; Kumar, R. K.; Hirtz, M.; Niemeyer, C. M., Multiscale Origami Structures as Interface for Cells. *Angewandte Chemie (International ed. in English)* **2015**, *54* (52), 15813-7.
20. Erkelenz, M.; Kuo, C.-H.; Niemeyer, C. M., DNA-Mediated Assembly of Cytochrome P450 BM3 Subdomains. *Journal of the American Chemical Society* **2011**, *133* (40), 16111-16118.

21. Niemeyer, C. M.; Koehler, J.; Wuerdemann, C., DNA-Directed Assembly of Bienzymic Complexes from In Vivo Biotinylated NAD(P)H:FMN Oxidoreductase and Luciferase. *ChemBioChem* **2002**, 3 (2-3), 242-245.
22. Oltra, N. S.; Bos, J.; Roelfes, G., Control over enzymatic activity by DNA-directed split enzyme reassembly. *ChemBiochem* **2010**, 11 (16), 2255-8.
23. DeRose, R.; Miyamoto, T.; Inoue, T., Manipulating signaling at will: chemically-inducible dimerization (CID) techniques resolve problems in cell biology. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* **2013**, 465 (3), 409-17.
24. Shan, M.; Bujotzek, A.; Abendroth, F.; Wellner, A.; Gust, R.; Seitz, O.; Weber, M.; Haag, R., Conformational Analysis of Bivalent Estrogen Receptor Ligands: From Intramolecular to Intermolecular Binding. *ChemBioChem* **2011**, 12 (17), 2587-2598.
25. Abendroth, F.; Bujotzek, A.; Shan, M.; Haag, R.; Weber, M.; Seitz, O., DNA-Controlled Bivalent Presentation of Ligands for the Estrogen Receptor. *Angewandte Chemie International Edition* **2011**, 50 (37), 8592-8596.
26. Bandlow, V.; Liese, S.; Lauster, D.; Ludwig, K.; Netz, R. R.; Herrmann, A.; Seitz, O., Spatial Screening of Hemagglutinin on Influenza A Virus Particles: Sialyl-LacNAc Displays on DNA and PEG Scaffolds Reveal the Requirements for Bivalency Enhanced Interactions with Weak Monovalent Binders. *Journal of the American Chemical Society* **2017**, 139 (45), 16389-16397.
27. Fasting, C.; Schalley, C. A.; Weber, M.; Seitz, O.; Hecht, S.; Koksche, B.; Darnedde, J.; Graf, C.; Knapp, E. W.; Haag, R., Multivalency as a chemical organization and action principle. *Angewandte Chemie (International ed. in English)* **2012**, 51 (42), 10472-98.
28. Sriram, S. M.; Banerjee, R.; Kane, R. S.; Kwon, Y. T., Multivalency-Assisted Control of Intracellular Signaling Pathways: Application for Ubiquitin-Dependent N-End Rule Pathway. *Chemistry & biology* **2009**, 16 (2), 121-131.
29. Huskens, J., Multivalent interactions at interfaces. *Current Opinion in Chemical Biology* **2006**, 10 (6), 537-543.
30. Lees, W. J.; Spaltenstein, A.; Kingery-Wood, J. E.; Whitesides, G. M., Polyacrylamides Bearing Pendant .alpha.-Sialoside Groups Strongly Inhibit Agglutination of Erythrocytes by Influenza A Virus: Multivalency and Steric Stabilization of Particulate Biological Systems. *Journal of Medicinal Chemistry* **1994**, 37 (20), 3419-3433.
31. Mammen, M.; Dahmann, G.; Whitesides, G. M., Effective Inhibitors of Hemagglutination by Influenza Virus Synthesized from Polymers Having Active Ester Groups. Insight into Mechanism of Inhibition. *Journal of Medicinal Chemistry* **1995**, 38 (21), 4179-4190.
32. Joshi, A.; Vance, D.; Rai, P.; Thiyagarajan, A.; Kane, R. S., The Design of Polyvalent Therapeutics. *Chemistry – A European Journal* **2008**, 14 (26), 7738-7747.
33. Kiessling, L. L.; Gestwicki, J. E.; Strong, L. E., Synthetic Multivalent Ligands as Probes of Signal Transduction. *Angewandte Chemie International Edition* **2006**, 45 (15), 2348-2368.
34. Kane, R. S., Thermodynamics of Multivalent Interactions: Influence of the Linker. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* **2010**, 26 (11), 8636-8640.
35. Kitov, P. I.; Bundle, D. R., On the Nature of the Multivalency Effect: A Thermodynamic Model. *Journal of the American Chemical Society* **2003**, 125 (52), 16271-16284.
36. Bromfield, S. M.; Posocco, P.; Fermeglia, M.; Tolosa, J.; Herreros-López, A.; Pricl, S.; Rodríguez-López, J.; Smith, D. K., Shape-Persistent and Adaptive Multivalency: Rigid Transgeden (TGD) and Flexible PAMAM Dendrimers for Heparin Binding. *Chemistry – A European Journal* **2014**, 20 (31), 9666-9674.
37. Kiessling, L. L.; Gestwicki, J. E.; Strong, L. E., Synthetic multivalent ligands in the exploration of cell-surface interactions. *Curr Opin Chem Biol* **2000**, 4 (6), 696-703.
38. Krishnamurthy, V. N.; Semetey, V.; Bracher, P. J.; Shen, N.; Whitesides, G. M., *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 1312.
39. Tian, L.; Heyduk, T., Bivalent Ligands with Long Nanometer-Scale Flexible Linkers. *Biochemistry* **2009**, 48 (2), 264-275.
40. Schwefel, D.; Maierhofer, C.; Beck, J. G.; Seeberger, S.; Diederichs, K.; Möller, H. M.; Welte, W.; Wittmann, V., Structural Basis of Multivalent Binding to Wheat Germ Agglutinin. *Journal of the American Chemical Society* **2010**, 132 (25), 8704-8719.
41. Gestwicki, J. E.; Cairo, C. W.; Strong, L. E.; Oetjen, K. A.; Kiessling, L. L., Influencing Receptor-Ligand Binding Mechanisms with Multivalent Ligand Architecture. *Journal of the American Chemical Society* **2002**, 124 (50), 14922-14933.

42. Roy, R.; Zanini, D.; Meunier, S. J.; Romanowska, A., Solid-phase synthesis of dendritic sialoside inhibitors of influenza A virus haemagglutinin. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* **1993**, (24), 1869-1872.
43. Bovin, N. V.; Gabius, H. J., Polymer-immobilized carbohydrate ligands: versatile chemical tools for biochemistry and medical sciences. *Chemical Society Reviews* **1995**, 24 (6), 413-421.
44. Kingery-Wood, J. E.; Williams, K. W.; Sigal, G. B.; Whitesides, G. M., The agglutination of erythrocytes by influenza virus is strongly inhibited by liposomes incorporating an analog of sialyl gangliosides. *Journal of the American Chemical Society* **1992**, 114 (18), 7303-7305.
45. Westwell, M. S.; Bardsley, B.; Dancer, R. J.; Try, A. C.; Williams, D. H., Cooperativity in ligand binding expressed at a model cell membrane by the vancomycin group antibiotics. *Chemical Communications* **1996**, (5), 589-590.
46. Sun, H.; Zhu, X.; Lu, P. Y.; Rosato, R. R.; Tan, W.; Zu, Y., Oligonucleotide aptamers: new tools for targeted cancer therapy. *Molecular therapy. Nucleic acids* **2014**, 3, e182.
47. K. Singh, S.; A. Koshkin, A.; Wengel, J.; Nielsen, P., LNA (locked nucleic acids): synthesis and high-affinity nucleic acid recognition. *Chemical Communications* **1998**, (4), 455-456.
48. Egholm, M.; Buchardt, O.; Christensen, L.; Behrens, C.; Freier, S. M.; Driver, D. A.; Berg, R. H.; Kim, S. K.; Norden, B.; Nielsen, P. E., PNA hybridizes to complementary oligonucleotides obeying the Watson–Crick hydrogen-bonding rules. *Nature* **1993**, 365 (6446), 566-568.
49. Shakeel, S.; Karim, S.; Ali, A., Peptide nucleic acid (PNA) — a review. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* **2006**, 81 (6), 892-899.
50. Matsuura, K.; Hibino, M.; Ikeda, T.; Yamada, Y.; Kobayashi, K., Self-Organized Glycoclusters Along DNA: Effect of the Spatial Arrangement of Galactoside Residues on Cooperative Lectin Recognition. *Chemistry – A European Journal* **2004**, 10 (2), 352-359.
51. Matsuura, K.; Hibino, M.; Yamada, Y.; Kobayashi, K., Construction of Glyco-Clusters by Self-Organization of Site-Specifically Glycosylated Oligonucleotides and Their Cooperative Amplification of Lectin-Recognition. *Journal of the American Chemical Society* **2001**, 123 (2), 357-358.
52. Diezmann, F.; Seitz, O., DNA-guided display of proteins and protein ligands for the interrogation of biology. *Chemical Society Reviews* **2011**, 40 (12), 5789-5801.
53. Teller, C.; Willner, I., Organizing protein–DNA hybrids as nanostructures with programmed functionalities. *Trends in Biotechnology* **2010**, 28 (12), 619-628.
54. Wilner, O. I.; Willner, I., Functionalized DNA Nanostructures. *Chemical Reviews* **2012**, 112 (4), 2528-2556.
55. Abendroth, F.; Seitz, O., Double-Clicking Peptides onto Phosphorothioate Oligonucleotides: Combining Two Proapoptotic Agents in One Molecule. *Angewandte Chemie International Edition* **2014**, 53 (39), 10504-10509.
56. Spinelli, N.; Defrancq, E.; Morvan, F., Glycoclusters on oligonucleotide and PNA scaffolds: synthesis and applications. *Chemical Society Reviews* **2013**, 42 (11), 4557-4573.
57. Malinovskii, V. L.; Wenger, D.; Haner, R., Nucleic acid-guided assembly of aromatic chromophores. *Chem Soc Rev* **2010**, 39 (2), 410-22.
58. Demidov, V. V.; Dokholyan, N. V.; Witte-Hoffmann, C.; Chalasani, P.; Yiu, H.-W.; Ding, F.; Yu, Y.; Cantor, C. R.; Broude, N. E., Fast complementation of split fluorescent protein triggered by DNA hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2006**, 103 (7), 2052-2056.
59. Wilner, O. I.; Shimron, S.; Weizmann, Y.; Wang, Z. G.; Willner, I., Self-assembly of enzymes on DNA scaffolds: en route to biocatalytic cascades and the synthesis of metallic nanowires. *Nano Lett* **2009**, 9 (5), 2040-3.
60. Cissell, K. A.; Rahimi, Y.; Shrestha, S.; Deo, S. K., Reassembly of a Bioluminescent Protein Renilla Luciferase Directed through DNA Hybridization. *Bioconjugate Chemistry* **2009**, 20 (1), 15-19.
61. Janssen, B. M. G.; Lempens, E. H. M.; Olijve, L. L. C.; Voets, I. K.; van Dongen, J. L. J.; de Greef, T. F. A.; Merckx, M., Reversible blocking of antibodies using bivalent peptide-DNA conjugates allows protease-activatable targeting. *Chemical Science* **2013**, 4 (4), 1442-1450.
62. Dix, A. V.; Moss, S. M.; Phan, K.; Hoppe, T.; Paoletta, S.; Kozma, E.; Gao, Z. G.; Durell, S. R.; Jacobson, K. A.; Appella, D. H., Programmable nanoscaffolds that control ligand display to a G-protein-coupled receptor in membranes to allow dissection of multivalent effects. *J Am Chem Soc* **2014**, 136 (35), 12296-303.

63. Paar, J. M.; Harris, N. T.; Holowka, D.; Baird, B., Bivalent Ligands with Rigid Double-Stranded DNA Spacers Reveal Structural Constraints on Signaling by FcεRI. *The Journal of Immunology* **2002**, 169 (2), 856-864.
64. Scheibe, C.; Bujotzek, A.; Dervede, J.; Weber, M.; Seitz, O., DNA-programmed spatial screening of carbohydrate–lectin interactions. *Chemical Science* **2011**, 2 (4), 770-775.
65. Collins, B. M.; McCoy, A. J.; Kent, H. M.; Evans, P. R.; Owen, D. J., Molecular Architecture and Functional Model of the Endocytic AP2 Complex. *Cell* **2002**, 109 (4), 523-535.
66. Olesen, L. E.; Ford, M. G.; Schmid, E. M.; Vallis, Y.; Babu, M. M.; Li, P. H.; Mills, I. G.; McMahon, H. T.; Praefcke, G. J., Solitary and repetitive binding motifs for the AP2 complex alpha-appendage in amphiphysin and other accessory proteins. *The Journal of biological chemistry* **2008**, 283 (8), 5099-109.
67. Marczyneke, M.; Groger, K.; Seitz, O., Selective Binders of the Tandem Src Homology 2 Domains in Syk and Zap70 Protein Kinases by DNA-Programmed Spatial Screening. *Bioconjug Chem* **2017**, 28 (9), 2384-2392.
68. Chhabra, R.; Sharma, J.; Ke, Y.; Liu, Y.; Rinker, S.; Lindsay, S.; Yan, H., Spatially Addressable Multiprotein Nanoarrays Templated by Aptamer-Tagged DNA Nanoarchitectures. *Journal of the American Chemical Society* **2007**, 129 (34), 10304-10305.
69. Huang, D.; Patel, K.; Perez-Garrido, S.; Marshall, J. F.; Palma, M., DNA Origami Nanoarrays for Multivalent Investigations of Cancer Cell Spreading with Nanoscale Spatial Resolution and Single-Molecule Control. *ACS Nano* **2019**, 13 (1), 728-736.
70. Li, S.; Purdy, W. C., Cyclodextrins and their applications in analytical chemistry. *Chemical Reviews* **1992**, 92 (6), 1457-1470.
71. Barrow, S. J.; Kasera, S.; Rowland, M. J.; del Barrio, J.; Scherman, O. A., Cucurbituril-Based Molecular Recognition. *Chemical Reviews* **2015**, 115 (22), 12320-12406.
72. Hamai, S.; Nakamura, A., *Inclusion Complexes of Cyclodextrins in Aqueous Solutions*. 2004; Vol. 35.
73. Brian, D. W., Recent Applications of Host-Guest Inclusion in Fluorescence-Based Trace Analysis. *Current Analytical Chemistry* **2007**, 3 (3), 183-195.
74. Liu, Y.; You, C.-C., Inclusion complexation of β-cyclodextrin and 6-O-α--maltosyl- and 2-O-(2-hydroxypropyl)-β-cyclodextrins -with some fluorescent dyes. *Journal of Physical Organic Chemistry* **2000**, 14 (1), 11-16.
75. Rekharsky, M. V.; Inoue, Y., Complexation Thermodynamics of Cyclodextrins. *Chemical Reviews* **1998**, 98 (5), 1875-1918.
76. Liu, Y.; Li, C.-J.; Guo, D.-S.; Pan, Z.-H.; Li, Z., A Comparative Study of Complexation of β-Cyclodextrin, Calix[4]arenesulfonate and Cucurbit[7]uril with Dye Guests: Fluorescence Behavior and Binding Ability. *Supramolecular Chemistry* **2007**, 19 (7), 517-523.
77. Politzer, I. R.; Crago, K. T.; Hampton, T.; Joseph, J.; Boyer, J. H.; Shah, M., Effect of β-cyclodextrin on the fluorescence, absorption and lasing of rhodamine 6G, rhodamine B and fluorescein disodium salt in aqueous solutions. *Chemical Physics Letters* **1989**, 159 (2), 258-262.
78. Nau, W. M.; Mohanty, J., Taming fluorescent dyes with cucurbituril. *International Journal of Photoenergy* **2005**, 7 (3).
79. Joseph, R.; Nkrumah, A.; Clark, R. J.; Masson, E., Stabilization of Cucurbituril/Guest Assemblies via Long-Range Coulombic and CH...O Interactions. *Journal of the American Chemical Society* **2014**, 136 (18), 6602-6607.
80. Halterman, R. L.; Moore, J. L.; Yakshe, K. A.; Halterman, J. A. I.; Woodson, K. A., Inclusion complexes of cationic xanthene dyes in cucurbit[7]uril. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry* **2010**, 66 (3), 231-241.
81. Liu, S.; Ruspic, C.; Mukhopadhyay, P.; Chakrabarti, S.; Zavalij, P. Y.; Isaacs, L., The Cucurbit[n]uril Family: Prime Components for Self-Sorting Systems. *Journal of the American Chemical Society* **2005**, 127 (45), 15959-15967.
82. Lagona, J.; Mukhopadhyay, P.; Chakrabarti, S.; Isaacs, L., The Cucurbit[n]uril Family. *Angewandte Chemie International Edition* **2005**, 44 (31), 4844-4870.
83. Sayo, O. F.; Mark, L.; Kristin, A. F.; Xiaodong, H.; Aleeta, M. P.; Isiah, M. W., Cyclodextrins Host-Guest Chemistry in Analytical and Environmental Chemistry. *Current Analytical Chemistry* **2007**, 3 (3), 171-181.
84. Dsouza, R. N.; Pischel, U.; Nau, W. M., Fluorescent Dyes and Their Supramolecular Host/Guest Complexes with Macrocycles in Aqueous Solution. *Chemical Reviews* **2011**, 111 (12), 7941-7980.

85. Houk, K. N.; Leach, A. G.; Kim, S. P.; Zhang, X., Binding affinities of host-guest, protein-ligand, and protein-transition-state complexes. *Angewandte Chemie (International ed. in English)* **2003**, 42 (40), 4872-97.
86. Zhang, B.; Breslow, R., Enthalpic domination of the chelate effect in cyclodextrin dimers. *Journal of the American Chemical Society* **1993**, 115 (20), 9353-9354.
87. Liu, S.; Zavalij, P. Y.; Isaacs, L., Cucurbit[10]uril. *Journal of the American Chemical Society* **2005**, 127 (48), 16798-16799.
88. Nau, W. M.; Florea, M.; Assaf, K. I., Deep Inside Cucurbiturils: Physical Properties and Volumes of their Inner Cavity Determine the Hydrophobic Driving Force for Host-Guest Complexation. *Israel Journal of Chemistry* **2011**, 51 (5-6), 559-577.
89. Moghaddam, S.; Yang, C.; Rekharsky, M.; Ko, Y. H.; Kim, K.; Inoue, Y.; Gilson, M. K., New Ultrahigh Affinity Host-Guest Complexes of Cucurbit[7]uril with Bicyclo[2.2.2]octane and Adamantane Guests: Thermodynamic Analysis and Evaluation of M2 Affinity Calculations. *Journal of the American Chemical Society* **2011**, 133 (10), 3570-3581.
90. Vázquez, J.; Remón, P.; Dsouza, R. N.; Lazar, A. I.; Arteaga, J. F.; Nau, W. M.; Pischel, U., A Simple Assay for Quality Binders to Cucurbiturils. *Chemistry – A European Journal* **2014**, 20 (32), 9897-9901.
91. Day, A.; Arnold, A. P.; Blanch, R. J.; Snushall, B., Controlling Factors in the Synthesis of Cucurbituril and Its Homologues. *The Journal of Organic Chemistry* **2001**, 66 (24), 8094-8100.
92. Kim, J.; Jung, I.-S.; Kim, S.-Y.; Lee, E.; Kang, J.-K.; Sakamoto, S.; Yamaguchi, K.; Kim, K., New Cucurbituril Homologues: Syntheses, Isolation, Characterization, and X-ray Crystal Structures of Cucurbit[n]uril (n = 5, 7, and 8). *Journal of the American Chemical Society* **2000**, 122 (3), 540-541.
93. Marquez, C.; Huang, F.; Nau, W. M., Cucurbiturils: molecular nanocapsules for time-resolved fluorescence-based assays. *IEEE transactions on nanobioscience* **2004**, 3 (1), 39-45.
94. Cao, L.; Šekutor, M.; Zavalij, P. Y.; Mlinarić-Majerski, K.; Glaser, R.; Isaacs, L., Cucurbit[7]uril-Guest Pair with an Attomolar Dissociation Constant. *Angewandte Chemie International Edition* **2014**, 53 (4), 988-993.
95. Assaf, K. I.; Nau, W. M., Cucurbiturils: from synthesis to high-affinity binding and catalysis. *Chemical Society Reviews* **2015**, 44 (2), 394-418.
96. Connors, K. A., The Stability of Cyclodextrin Complexes in Solution. *Chemical Reviews* **1997**, 97 (5), 1325-1358.
97. Lucas, D.; Minami, T.; Iannuzzi, G.; Cao, L.; Wittenberg, J. B.; Anzenbacher, P.; Isaacs, L., Templated Synthesis of Glycoluril Hexamer and Monofunctionalized Cucurbit[6]uril Derivatives. *Journal of the American Chemical Society* **2011**, 133 (44), 17966-17976.
98. Gong, B.; Choi, B.-K.; Kim, J.-Y.; Shetty, D.; Ko, Y. H.; Selvapalam, N.; Lee, N. K.; Kim, K., High Affinity Host-Guest FRET Pair for Single-Vesicle Content-Mixing Assay: Observation of Flickering Fusion Events. *Journal of the American Chemical Society* **2015**, 137 (28), 8908-8911.
99. Wagner, Brian, D.
100. Uings, I. J.; Farrow, S. N., Cell receptors and cell signalling. *Molecular Pathology* **2000**, 53 (6), 295-299.
101. Ali, M. H.; Imperiali, B., Protein oligomerization: how and why. *Bioorganic & medicinal chemistry* **2005**, 13 (17), 5013-20.
102. Ferre, S.; Casado, V.; Devi, L. A.; Filizola, M.; Jockers, R.; Lohse, M. J.; Milligan, G.; Pin, J. P.; Guitart, X., G protein-coupled receptor oligomerization revisited: functional and pharmacological perspectives. *Pharmacological reviews* **2014**, 66 (2), 413-34.
103. Lemmon, M. A.; Schlessinger, J., Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* **2010**, 141 (7), 1117-34.
104. Citri, A.; Yarden, Y., EGF-ERBB signalling: towards the systems level. *Nature reviews. Molecular cell biology* **2006**, 7 (7), 505-16.
105. Spencer, D. M.; Wandless, T. J.; Schreiber, S. L.; Crabtree, G. R., Controlling signal transduction with synthetic ligands. *Science* **1993**, 262 (5136), 1019-24.
106. Sullivan, L. A.; Brekken, R. A., The VEGF family in cancer and antibody-based strategies for their inhibition. *mAbs* **2010**, 2 (2), 165-75.
107. Youssoufian, H.; Hicklin, D. J.; Rowinsky, E. K., Review: Monoclonal Antibodies to the Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2 in Cancer Therapy. *Clinical Cancer Research* **2007**, 13 (18), 5544s.

108. Fontanella, C.; Ongaro, E.; Bolzonello, S.; Guardascione, M.; Fasola, G.; Aprile, G., Clinical advances in the development of novel VEGFR2 inhibitors. *Annals of translational medicine* **2014**, 2 (12), 123.
109. Hamerlik, P.; Lathia, J. D.; Rasmussen, R.; Wu, Q.; Bartkova, J.; Lee, M.; Moudry, P.; Bartek, J., Jr.; Fischer, W.; Lukas, J.; Rich, J. N.; Bartek, J., Autocrine VEGF-VEGFR2-Neuropilin-1 signaling promotes glioma stem-like cell viability and tumor growth. *The Journal of experimental medicine* **2012**, 209 (3), 507-20.
110. Ebos, J. M.; Bocci, G.; Man, S.; Thorpe, P. E.; Hicklin, D. J.; Zhou, D.; Jia, X.; Kerbel, R. S., A naturally occurring soluble form of vascular endothelial growth factor receptor 2 detected in mouse and human plasma. *Molecular cancer research : MCR* **2004**, 2 (6), 315-26.
111. Aprile, G.; Bonotto, M.; Ongaro, E.; Pozzo, C.; Giuliani, F., Critical appraisal of ramucirumab (IMC-1121B) for cancer treatment: from benchside to clinical use. *Drugs* **2013**, 73 (18), 2003-15.
112. Spratlin, J. L.; Mulder, K. E.; Mackey, J. R., Ramucirumab (IMC-1121B): a novel attack on angiogenesis. *Future oncology (London, England)* **2010**, 6 (7), 1085-94.
113. Spratlin, J. L.; Cohen, R. B.; Eadens, M.; Gore, L.; Camidge, D. R.; Diab, S.; Leong, S.; O'Bryant, C.; Chow, L. Q.; Serkova, N. J.; Meropol, N. J.; Lewis, N. L.; Chiorean, E. G.; Fox, F.; Youssoufian, H.; Rowinsky, E. K.; Eckhardt, S. G., Phase I pharmacologic and biologic study of ramucirumab (IMC-1121B), a fully human immunoglobulin G1 monoclonal antibody targeting the vascular endothelial growth factor receptor-2. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **2010**, 28 (5), 780-7.
114. Udugamasooriya, D. G.; Dineen, S. P.; Brekken, R. A.; Kodadek, T., A peptoid "antibody surrogate" that antagonizes VEGF receptor 2 activity. *J Am Chem Soc* **2008**, 130 (17), 5744-52.
115. Stevenson, G. T., Is antibody therapy of tumor compromised by infusion-related reactions?: A case for inhibiting the activity of cyclooxygenase-2. *Leukemia Research* **2005**, 29 (3), 239-246.
116. Mateo, C.; Lombardero, J.; Moreno, E.; Morales, A.; Bombino, G.; Coloma, J.; Wims, L.; Morrison, S. L.; Perez, R., Removal of amphipathic epitopes from genetically engineered antibodies: production of modified immunoglobulins with reduced immunogenicity. *Hybridoma* **2000**, 19 (6), 463-71.
117. Claesson-Welsh, L.; Welsh, M., VEGFA and tumour angiogenesis. *Journal of internal medicine* **2013**, 273 (2), 114-27.
118. Tian, S.; Quan, H.; Xie, C.; Guo, H.; Lu, F.; Xu, Y.; Li, J.; Lou, L., YN968D1 is a novel and selective inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor-2 tyrosine kinase with potent activity in vitro and in vivo. *Cancer science* **2011**, 102 (7), 1374-80.
119. Ying, M.; Shen, Q.; Liu, Y.; Yan, Z.; Wei, X.; Zhan, C.; Gao, J.; Xie, C.; Yao, B.; Lu, W., Stabilized Heptapeptide A7R for Enhanced Multifunctional Liposome-Based Tumor-Targeted Drug Delivery. *ACS applied materials & interfaces* **2016**, 8 (21), 13232-41.
120. Vicari, D.; Foy, K. C.; Liotta, E. M.; Kaumaya, P. T., Engineered conformation-dependent VEGF peptide mimics are effective in inhibiting VEGF signaling pathways. *The Journal of biological chemistry* **2011**, 286 (15), 13612-25.
121. Binétruy-Tournaire, R.; Demangel, C.; Malavaud, B.; Vassy, R.; Rouyre, S.; Kraemer, M.; Plouët, J.; Derbin, C.; Perret, G.; Mazié, J. C., Identification of a peptide blocking vascular endothelial growth factor (VEGF)-mediated angiogenesis. *The EMBO Journal* **2000**, 19 (7), 1525-1533.
122. Tirand, L.; Frochot, C.; Vanderesse, R.; Thomas, N.; Trinquet, E.; Pinel, S.; Viriot, M. L.; Guillemin, F.; Barberi-Heyob, M., A peptide competing with VEGF165 binding on neuropilin-1 mediates targeting of a chlorin-type photosensitizer and potentiates its photodynamic activity in human endothelial cells. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* **2006**, 111 (1-2), 153-64.
123. Simon, R. J.; Kania, R. S.; Zuckermann, R. N.; Huebner, V. D.; Jewell, D. A.; Banville, S.; Ng, S.; Wang, L.; Rosenberg, S.; Marlowe, C. K., Peptoids: a modular approach to drug discovery. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1992**, 89 (20), 9367.
124. Brekken, R. A.; Huang, X.; King, S. W.; Thorpe, P. E., Vascular Endothelial Growth Factor as a Marker of Tumor Endothelium. *Cancer Research* **1998**, 58 (9), 1952.
125. Lu, D.; Jimenez, X.; Zhang, H.; Bohlen, P.; Witte, L.; Zhu, Z., Selection of high affinity human neutralizing antibodies to VEGFR2 from a large antibody phage display library for antiangiogenesis therapy. *International Journal of Cancer* **2001**, 97 (3), 393-399.
126. Bridgewater, R. E.; Norman, J. C.; Caswell, P. T., Integrin trafficking at a glance. *Journal of Cell Science* **2012**, 125 (16), 3695.
127. Calderwood, D. A., Integrin activation. *Journal of Cell Science* **2004**, 117 (5), 657.

128. Kim, C.; Ye, F.; Ginsberg, M. H., Regulation of integrin activation. *Annual review of cell and developmental biology* **2011**, *27*, 321-45.
129. Auzzas, L.; Zanardi, F.; Battistini, L.; Burreddu, P.; Carta, P.; Rassu, G.; Curti, C.; Casiraghi, G., Targeting $\alpha\beta_3$ Integrin: Design and Applications of Mono- and Multifunctional RGD-Based Peptides and Semipeptides. *Current Medicinal Chemistry* **2010**, *17* (13), 1255-1299.
130. Hynes, R. O., Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* **2002**, *110* (6), 673-87.
131. Folkman, J.; Klagsbrun, M., Angiogenic factors. *Science* **1987**, *235* (4787), 442.
132. Risau, W., Mechanisms of angiogenesis. *Nature* **1997**, *386* (6626), 671-4.
133. Mahabeleshwar, G. H.; Chen, J.; Feng, W.; Somanath, P. R.; Razorenova, O. V.; Byzova, T. V., Integrin affinity modulation in angiogenesis. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* **2008**, *7* (3), 335-347.
134. Ruoslahti, E.; Pierschbacher, M. D., New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. *Science* **1987**, *238* (4826), 491-7.
135. Schottelius, M.; Laufer, B.; Kessler, H.; Wester, H.-J., Ligands for Mapping $\alpha\beta_3$ -Integrin Expression in Vivo. *Accounts of Chemical Research* **2009**, *42* (7), 969-980.
136. Craig, W. S.; Cheng, S.; Mullen, D. G.; Blevitt, J.; Pierschbacher, M. D., Concept and progress in the development of RGD-containing peptide pharmaceuticals. *Biopolymers* **1995**, *37* (2), 157-75.
137. Edwards, D.; Jones, P.; Haramis, H.; Battle, M.; Lear, R.; Barnett, D. J.; Edwards, C.; Crawford, H.; Black, A.; Godden, V., ^{99m}Tc -NC100692--a tracer for imaging vitronectin receptors associated with angiogenesis: a preclinical investigation. *Nuclear medicine and biology* **2008**, *35* (3), 365-75.
138. Müller, G.; Gurrath, M.; Kessler, H.; Timpl, R., Dynamic Forcing, a Method for Evaluating Activity and Selectivity Profiles of RGD (Arg-Gly-Asp) Peptides. *Angewandte Chemie International Edition in English* **1992**, *31* (3), 326-328.
139. Dechantsreiter, M. A.; Planker, E.; Mathä, B.; Lohof, E.; Hölzemann, G.; Jonczyk, A.; Goodman, S. L.; Kessler, H., N-Methylated Cyclic RGD Peptides as Highly Active and Selective $\alpha\beta_3$ Integrin Antagonists. *Journal of Medicinal Chemistry* **1999**, *42* (16), 3033-3040.
140. Haviv, F.; Fitzpatrick, T. D.; Swenson, R. E.; Nichols, C. J.; Mort, N. A.; Bush, E. N.; Diaz, G.; Bammert, G.; Nguyen, A.; Rhutasel, N. S.; et al., Effect of N-methyl substitution of the peptide bonds in luteinizing hormone-releasing hormone agonists. *J Med Chem* **1993**, *36* (3), 363-9.
141. Wormser, U.; Laufer, R.; Hart, Y.; Chorev, M.; Gilon, C.; Selinger, Z., Highly selective agonists for substance P receptor subtypes. *Embo j* **1986**, *5* (11), 2805-8.
142. Haubner, R.; Gratias, R.; Diefenbach, B.; Goodman, S. L.; Jonczyk, A.; Kessler, H., Structural and Functional Aspects of RGD-Containing Cyclic Pentapeptides as Highly Potent and Selective Integrin $\alpha\beta_3$ Antagonists. *Journal of the American Chemical Society* **1996**, *118* (32), 7461-7472.
143. Taga, T.; Suzuki, A.; Gonzalez-Gomez, I.; Gilles, F. H.; Stins, M.; Shimada, H.; Barsky, L.; Weinberg, K. I.; Laug, W. E., α_v -Integrin antagonist EMD 121974 induces apoptosis in brain tumor cells growing on vitronectin and tenascin. *Int J Cancer* **2002**, *98* (5), 690-7.
144. Paolillo, M.; Russo, M. A.; Serra, M.; Colombo, L.; Schinelli, S., Small molecule integrin antagonists in cancer therapy. *Mini reviews in medicinal chemistry* **2009**, *9* (12), 1439-46.
145. MacDonald, T. J.; Taga, T.; Shimada, H.; Tabrizi, P.; Zlokovic, B. V.; Cheres, D. A.; Laug, W. E., Preferential susceptibility of brain tumors to the antiangiogenic effects of an α_v integrin antagonist. *Neurosurgery* **2001**, *48* (1), 151-7.
146. Buerkle, M. A.; Pahernik, S. A.; Sutter, A.; Jonczyk, A.; Messmer, K.; Dellian, M., Inhibition of the α_v integrins with a cyclic RGD peptide impairs angiogenesis, growth and metastasis of solid tumours in vivo. *British Journal of Cancer* **2002**, *86* (5), 788-795.
147. Smith, J. W., Cilengitide Merck. *Current opinion in investigational drugs (London, England : 2000)* **2003**, *4* (6), 741-5.
148. Mas-Moruno, C.; Rechenmacher, F.; Kessler, H., Cilengitide: the first anti-angiogenic small molecule drug candidate design, synthesis and clinical evaluation. *Anti-cancer agents in medicinal chemistry* **2010**, *10* (10), 753-768.
149. Thumshirn, G.; Hersel, U.; Goodman, S. L.; Kessler, H., Multimeric Cyclic RGD Peptides as Potential Tools for Tumor Targeting: Solid-Phase Peptide Synthesis and Chemoselective Oxime Ligation. *Chemistry – A European Journal* **2003**, *9* (12), 2717-2725.
150. Garanger, E.; Boturyn, D.; Coll, J.-L.; Favrot, M.-C.; Dumy, P., Multivalent RGD synthetic peptides as potent $\alpha\beta_3$ integrin ligands. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2006**, *4* (10), 1958-1965.

151. Englund, E. A.; Wang, D.; Fujigaki, H.; Sakai, H.; Micklitsch, C. M.; Ghirlando, R.; Martin-Manso, G.; Pendrak, M. L.; Roberts, D. D.; Durell, S. R.; Appella, D. H., Programmable multivalent display of receptor ligands using peptide nucleic acid nanoscaffolds. *Nature Communications* **2012**, *3*, 614.
152. Mahabeleshwar, G. H.; Feng, W.; Phillips, D. R.; Byzova, T. V., Integrin signaling is critical for pathological angiogenesis. *The Journal of experimental medicine* **2006**, *203* (11), 2495-2507.
153. Mahabeleshwar, G. H.; Feng, W.; Reddy, K.; Plow, E. F.; Byzova, T. V., Mechanisms of integrin-vascular endothelial growth factor receptor cross-activation in angiogenesis. *Circulation research* **2007**, *101* (6), 570-80.
154. Papo, N.; Silverman, A. P.; Lahti, J. L.; Cochran, J. R., Antagonistic VEGF variants engineered to simultaneously bind to and inhibit VEGFR2 and alphavbeta3 integrin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2011**, *108* (34), 14067-72.
155. De, S.; Razorenova, O.; McCabe, N. P.; O'Toole, T.; Qin, J.; Byzova, T. V., VEGF-integrin interplay controls tumor growth and vascularization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2005**, *102* (21), 7589-94.
156. Plow, E. F.; Haas, T. A.; Zhang, L.; Loftus, J.; Smith, J. W., Ligand binding to integrins. *The Journal of biological chemistry* **2000**, *275* (29), 21785-8.
157. Wang, S.-R.; Song, Y.-Y.; Wei, L.; Liu, C.-X.; Fu, B.-S.; Wang, J.-Q.; Yang, X.-R.; Liu, Y.-N.; Liu, S.-M.; Tian, T.; Zhou, X., Cucurbit[7]uril-Driven Host-Guest Chemistry for Reversible Intervention of 5-Formylcytosine-Targeted Biochemical Reactions. *Journal of the American Chemical Society* **2017**, *139* (46), 16903-16912.
158. Sil, D.; Lee, J. B.; Luo, D.; Holowka, D.; Baird, B., TRIVALENT LIGANDS WITH RIGID DNA SPACERS REVEAL STRUCTURAL REQUIREMENTS FOR IgE RECEPTOR SIGNALING IN RBL MAST CELLS. *ACS chemical biology* **2007**, *2* (10), 674-684.
159. Holowka, D.; Sil, D.; Torigoe, C.; Baird, B., Insights into immunoglobulin E receptor signaling from structurally defined ligands. *Immunological Reviews* **2007**, *217* (1), 269-279.
160. Boucrot, E.; Saffarian, S.; Zhang, R.; Kirchhausen, T., Roles of AP-2 in clathrin-mediated endocytosis. *PLoS one* **2010**, *5* (5), e10597.
161. Motley, A. M.; Berg, N.; Taylor, M. J.; Sahlender, D. A.; Hirst, J.; Owen, D. J.; Robinson, M. S., Functional analysis of AP-2 alpha and mu2 subunits. *Molecular biology of the cell* **2006**, *17* (12), 5298-308.
162. Gubar, O.; Morderer, D.; Tsyba, L.; Croisé, P.; Houy, S.; Ory, S.; Gasman, S.; Rynditch, A., Intersectin: The Crossroad between Vesicle Exocytosis and Endocytosis. *Frontiers in Endocrinology* **2013**, *4*, 109.
163. Schröder, S.; Ungewickell, E., Subunit interaction and function of clathrin-coated vesicle adaptors from the Golgi and the plasma membrane. *Journal of Biological Chemistry* **1991**, *266* (12), 7910-7918.
164. Owen, D. J.; Collins, B. M.; Evans, P. R., Adaptors for clathrin coats: structure and function. *Annual review of cell and developmental biology* **2004**, *20*, 153-91.
165. Bednar, J.; Furrer, P.; Katritch, V.; Stasiak, A. Z.; Dubochet, J.; Stasiak, A., Determination of DNA persistence length by cryo-electron microscopy. Separation of the static and dynamic contributions to the apparent persistence length of DNA. *Journal of molecular biology* **1995**, *254* (4), 579-94.
166. Kuzuya, A.; Ohnishi, T.; Wasano, T.; Nagaoka, S.; Sumaoka, J.; Ihara, T.; Jyo, A.; Komiyama, M., Efficient guest inclusion by beta-cyclodextrin attached to the ends of DNA oligomers upon hybridization to various DNA conjugates. *Bioconjug Chem* **2009**, *20* (8), 1643-9.
167. Ihara, T.; Uemura, A.; Futamura, A.; Shimizu, M.; Baba, N.; Nishizawa, S.; Teramae, N.; Jyo, A., Cooperative DNA Probing Using a β -Cyclodextrin-DNA Conjugate and a Nucleobase-Specific Fluorescent Ligand. *Journal of the American Chemical Society* **2009**, *131* (4), 1386-1387.
168. Ghosh, S. S.; Kao, P. M.; McCue, A. W.; Chappelle, H. L., Use of maleimide-thiol coupling chemistry for efficient syntheses of oligonucleotide-enzyme conjugate hybridization probes. *Bioconjugate Chemistry* **1990**, *1* (1), 71-76.
169. Petter, R. C.; Salek, J. S.; Sikorski, C. T.; Kumaravel, G.; Lin, F. T., Cooperative binding by aggregated mono-6-(alkylamino)- β -cyclodextrins. *Journal of the American Chemical Society* **1990**, *112* (10), 3860-3868.
170. Parsons, W. H.; Du Bois, J., Maleimide Conjugates of Saxitoxin as Covalent Inhibitors of Voltage-Gated Sodium Channels. *Journal of the American Chemical Society* **2013**, *135* (29), 10582-10585.
171. Yeo, W.-S.; Min, D.-H.; Hsieh, R. W.; Greene, G. L.; Mrksich, M., Label-Free Detection of Protein-Protein Interactions on Biochips. *Angewandte Chemie International Edition* **2005**, *44* (34), 5480-5483.
172. Diezmann, F.; Eberhard, H.; Seitz, O., Native chemical ligation in the synthesis of internally modified oligonucleotide-peptide conjugates. *Biopolymers* **2010**, *94* (4), 397-404.

173. Caruthers, M. H., Gene synthesis machines: DNA chemistry and its uses. *Science* **1985**, *230* (4723), 281-5.
174. Zhou, X.; Su, X.; Pathak, P.; Vik, R.; Vinciguerra, B.; Isaacs, L.; Jayawickramarajah, J., Host–Guest Tethered DNA Transducer: ATP Fueled Release of a Protein Inhibitor from Cucurbit[7]uril. *Journal of the American Chemical Society* **2017**, *139* (39), 13916-13921.
175. Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B., A Stepwise Huisgen Cycloaddition Process: Copper(I)-Catalyzed Regioselective “Ligation” of Azides and Terminal Alkynes. *Angewandte Chemie International Edition* **2002**, *41* (14), 2596-2599.
176. Tornøe, C. W.; Christensen, C.; Meldal, M., Peptidotriazoles on solid phase: [1,2,3]-triazoles by regiospecific copper(i)-catalyzed 1,3-dipolar cycloadditions of terminal alkynes to azides. *J Org Chem* **2002**, *67* (9), 3057-64.
177. Vinciguerra, B.; Cao, L.; Cannon, J. R.; Zavalij, P. Y.; Fenselau, C.; Isaacs, L., Synthesis and Self-Assembly Processes of Monofunctionalized Cucurbit[7]uril. *Journal of the American Chemical Society* **2012**, *134* (31), 13133-13140.
178. El-Sagheer, A. H.; Brown, T., Click chemistry with DNA. *Chemical Society Reviews* **2010**, *39* (4), 1388-1405.
179. Harris, D. C.; Saks, B. R.; Jayawickramarajah, J., Protein-Binding Molecular Switches via Host–Guest Stabilized DNA Hairpins. *Journal of the American Chemical Society* **2011**, *133* (20), 7676-7679.
180. Guéron, M.; Demaret, J. P.; Filoche, M., A Unified Theory of the B-Z Transition of DNA in High and Low Concentrations of Multivalent Ions. *Biophysical Journal* **2000**, *78* (2), 1070-1083.
181. Dubel, N.; Liese, S.; Scherz, F.; Seitz, O., Exploring the limits of bivalency by DNA-based spatial screening. *Angewandte Chemie International Edition* *0* (ja).
182. Witte, L.; Hicklin, D. J.; Zhu, Z.; Pytowski, B.; Kotanides, H.; Rockwell, P.; Böhlen, P., Monoclonal antibodies targeting the VEGF receptor-2 (Flk1/KDR) as an anti-angiogenic therapeutic strategy. *Cancer and Metastasis Reviews* **1998**, *17* (2), 155-161.
183. Lu, D.; Jimenez, X.; Zhang, H.; Bohlen, P.; Witte, L.; Zhu, Z., Selection of high affinity human neutralizing antibodies to VEGFR2 from a large antibody phage display library for antiangiogenesis therapy. *Int J Cancer* **2002**, *97* (3), 393-9.
184. Reynolds, A. R.; Hart, I. R.; Watson, A. R.; Welte, J. C.; Silva, R. G.; Robinson, S. D.; Da Violante, G.; Gourlaouen, M.; Salih, M.; Jones, M. C.; Jones, D. T.; Saunders, G.; Kostourou, V.; Perron-Sierra, F.; Norman, J. C.; Tucker, G. C.; Hodivala-Dilke, K. M., Stimulation of tumor growth and angiogenesis by low concentrations of RGD-mimetic integrin inhibitors. *Nature Medicine* **2009**, *15*, 392.
185. Astle, J. M.; Udugamasooriya, D. G.; Smallshaw, J. E.; Kodadek, T., A VEGFR2 Antagonist and Other Peptoids Evade Immune Recognition. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics* **2008**, *14* (3), 223-227.
186. Chatterjee, J.; Laufer, B.; Kessler, H., Synthesis of N-methylated cyclic peptides. *Nature protocols* **2012**, *7* (3), 432-44.
187. Seo, J.; Lee, B. C.; Zuckermann, R. N., 2.3 Peptoids: Synthesis, Characterization, and Nanostructures. 2017.
188. <https://www.proteinatlas.org> (accessed 28.8.).
189. Shibuya, M., Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Its Receptor (VEGFR) Signaling in Angiogenesis: A Crucial Target for Anti- and Pro-Angiogenic Therapies. *Genes & Cancer* **2011**, *2* (12), 1097-1105.

9 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Oliver Seitz für die Möglichkeit der Erstellung dieser Arbeit, das Bereitstellen des interessanten Forschungsthemas, sowie für die Unterstützung und die konstruktiven Anregungen. Ich bedanke mich beim Sonderforschungsbereich 765 für die Förderung und finanzielle Unterstützung dieser Arbeit.

Meiner Kooperationspartnerin Dr. Susanne Liese danke ich für die gute Zusammenarbeit und die Ausführung der mathematischen Berechnungen. Ich bedanke mich auch bei Christna Kuznia, Christina Klotz und Jacqueline Schneider für die Pflege der Zellen und der Hilfestellung bei den biologischen Experimenten. Auch bei dem Bachelorstudenten Hoa Le Xuan, der Forschungspraktikantin Marwa Bahri und den Auszubildenden Jasmin Kutz und Michelle Matschke bedanke ich mich, die mir eine große Hilfe bei der Fertigstellung dieser Dissertation waren.

Dem gesamten Arbeitskreis Seitz möchte ich für die schöne Atmosphäre und die gesamten Aktivitäten auch außerhalb des Labors danken. Vor allem möchte ich meinen Labor Kollegen Dr. Katharina Gröger, Dr. Andrea Knoll, Dr. Ramon Subiros Funosas, Magdalena Roth und Dino Gluhacevic für die schöne Zeit und die tolle Zusammenarbeit danken. Besonders möchte ich mich bei Christina Kuznia und Yannic Altrichter für das Korrekturlesen dieser Arbeit bedanken.

Mein größter Dank gilt meiner Familie, die mir während meiner gesamten Studien- und Promotionszeit ausnahmslos Rückhalt gegeben haben. Ich danke vor allem auch Henrik Petszulat, der mich nicht nur bei den guten Zeiten, sondern auch bei den schwierigen Momenten unterstützt hat.

Selbstständigkeitserklärung

Ich erkläre, dass ich die Dissertation selbständig und nur unter Verwendung der von mir gemäß § 7 Abs. 3 der Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät, veröffentlicht im Amtlichen Mitteilungsblatt der Humboldt-Universität zu Berlin Nr. 126/2014 am 18.11.2014 angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Datum, Unterschrift